

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-146192

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月2日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

A 6 1 K 31/70

A A F

A 6 1 K 31/70

A A F

A B S

A B S

A C D

A C D

A D A

A D A

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-348328

(22) 出願日 平成8年(1996)12月26日

(31) 優先権主張番号 特願平7-343371

(32) 優先日 平7(1995)12月28日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平8-59419

(32) 優先日 平8(1996)3月15日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平8-211805

(32) 優先日 平8(1996)8月12日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 日沼 州司

茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田

春日ハイツ1402号

(72) 発明者 羽畑 祐吾

茨城県つくば市並木3丁目17番地1 ロイ

ヤルコーポヨコタ606号

(72) 発明者 川俣 裕二

茨城県つくば市松代4丁目22番地 松代4

丁目団地2-203号

(74) 代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規生理活性物質、その製造法および用途

(57) 【要約】

【課題】新規生理活性物質、その製造法および用途の提供。

【解決手段】本発明は、ヒト下垂体およびマウス膵臓由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質がリガンドとして認識するポリペプチドに関する。本発明のポリペプチドまたは該ポリペプチドをコードするDNA等は、組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、下垂体機能調節剤、中枢機能調節剤または膵臓機能調節剤などの医薬の開発等に用いることができる。特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の治療・予防剤などとして使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：73で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩。

【請求項2】配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9、配列番号：10、配列番号：47、配列番号：48、配列番号：49、配列番号：50、配列番号：51、配列番号：52、配列番号：61、配列番号：62、配列番号：63、配列番号：64、配列番号：65または配列番号：66で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドである請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】配列番号：1、配列番号：44、配列番号：45または配列番号：59で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドである請求項1記載のポリペプチド。

【請求項4】請求項1記載のポリペプチドの部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩。

【請求項5】請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項6】配列番号：2、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13、配列番号：14、配列番号：15、配列番号：16、配列番号：17、配列番号：18、配列番号：46、配列番号：53、配列番号：54、配列番号：55、配列番号：56、配列番号：57、配列番号：58、配列番号：60、配列番号：67、配列番号：68、配列番号：69、配列番号：70、配列番号：71または配列番号：72で表される塩基配列を有する請求項5記載のDNA。

【請求項7】請求項5記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項8】請求項5記載のDNAまたは請求項7記載の組換えベクターを保持する形質転換体。

【請求項9】請求項8記載の形質転換体を培養することを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の部分ペプチドの製造法。

【請求項10】請求項1記載のポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩を含有してなる医薬。

【請求項11】請求項4記載の部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩を含有してなる医薬。

【請求項12】請求項5記載のDNAを含有してなる医薬。

【請求項13】下垂体機能調節剤である請求項10、請求項11または請求項12記載の医薬。

【請求項14】中枢神経機能調節剤である請求項10、請求項11または請求項12記載の医薬。

【請求項15】膵臓機能調節剤である請求項10、請求

項11または請求項12記載の医薬。

【請求項16】請求項1記載のポリペプチドまたは請求項1記載の部分ペプチドに対する抗体。

【請求項17】(i)配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の部分ペプチドを接触させた場合と(ii)配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の部分ペプチド、および試験化合物を接触させた場合との比較を行うことを特徴とする請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の部分ペプチドと、配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項18】請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の部分ペプチドと、配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物のスクリーニング用キット。

【請求項19】請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られる、請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の部分ペプチドと、配列番号：21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

【請求項20】請求項1記載のポリペプチドまたは請求項4記載の部分ペプチドをリガンドとして認識するG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドポリペプチド、及びこれをコードするDNAを含有するDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプターを通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役している guanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行い、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプターと総称される。このようなホルモンや神経伝達物質とG蛋白質共役型レセプターによる生体の機能を調節する経路の一つとして視

床下部・下垂体系がある。これは、視床下部ホルモン（向下垂体性ホルモン）によって下垂体からの下垂体ホルモンの分泌が調節され、血中に放出された下垂体ホルモンを介して標的細胞・器官の機能調節が行われるものである。この経路によって、ホメオスタシスの維持や生殖系、個体の発達、代謝、成長の調節などの生体にとって重要な機能調節が行われている。下垂体ホルモンは視床下部ホルモンと標的内分泌腺より分泌される末梢ホルモンによるポジティブフィードバック機構またはネガティブフィードバック機構によって分泌調節されている。下垂体に存在する各種のレセプター蛋白質は、視床下部・下垂体系を調節する上で中心的な役割を担っている。

【0003】また、これらのホルモン・因子およびそのレセプターは視床下部・下垂体系だけに限局して存在するのではなく、一般に脳内に広く分布することが知られている。このことは視床下部ホルモンと呼ばれている物質が、中枢神経系においては神経伝達物質あるいは神経調節物質として機能していると考えられている。また、末梢組織においても同様に分布し、それぞれ重要な機能を担っていると考えられている。膵臓は消化液を分泌する他にグルカゴンやインスリンを分泌することにより糖代謝に重要な役割を果たしている。インスリンは膵臓のβ細胞から分泌されるが、主としてグルコースにより促進される。しかしβ細胞には様々なレセプターが存在し、グルコース以外の様々な因子、ペプチドホルモン（ガラニン、ソマトスタチン、ガストリック・インヒビトリ・ポリペプチド、グルカゴン、アミリンなど）、糖（マンノースなど）、アミノ酸、神経伝達物質などにより、インスリンの分泌が制御されていることが知られている。これまでに上記G蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを決定する一般的な手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の一次構造上の類似性から推定するしかなかった。最近、動物細胞にリガンドが不明な、いわゆるオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを導入し、新規オピオイドペプチドを探索した例が報告されている（Reinscheid, R. K. et al., Science, 270巻、792-794頁、1995年、Menular, J.-C., et al., Nature 377巻、532-535頁、1995年）。しかしこの場合は既知G蛋白質共役型レセプター蛋白質との類似性や組織分布から、容易にリガンドはオピオイドペプチドのファミリーに属することが予想されていた。オピオイドレセプターを介して生体に作用する物質の研究・開発の歴史は長く、種々のアンタゴニスト・アゴニストが開発されていた。そこで人為的に合成した化合物群の中からこの受容体に対するアゴニストを見出し、それをプローブとして受容体cDNA導入細胞における受容体の発現を検証した後に、アゴニストと同じ様な細胞内情報伝達系の活性化物質を探索し、これを精製し、リガンドの構造を決定している。しかし、このようにオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の中で

リガンドがおおよそ推定されうるものはほとんどなく、特に、既知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーと類似性が低い場合、リガンドに関する情報はほとんどなく、リガンドを推定することは困難であった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】下垂体、中枢神経系および膵臓β細胞等で発現しているオーファンG蛋白質共役型レセプターに対するリガンドは、医薬として有用であると考えられるが、これまでにその構造および機能については明らかにされていない。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、オーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを適当な手段で発現させた細胞を用い、特異的な細胞刺激（シグナル伝達）活性の測定等を指標に、該レセプター蛋白質がリガンドとして認識するポリペプチドをスクリーニングすることに成功した。さらに、本発明者らは、該活性因子であるリガンドと上記レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうことができることを見いだした。

【0006】すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：73で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩、

(2) 配列番号：3、4、5、6、7、8、9、10、47、48、49、50、51、52、61、62、63、64、65または66で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドである第(1)項記載のポリペプチド。

(3) 配列番号：1、44、45または59で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドである第(1)項記載のポリペプチド、(4) 第(1)項記載のポリペプチドの部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩。

(5) 第(1)項記載のポリペプチドまたは第(4)項記載の部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(6) 配列番号：2、11、12、13、14、15、16、17、18、46、53、54、55、56、57、58、60、67、68、69、70、71または72で表される塩基配列を有する第(5)項記載のDNA、

(7) 第(5)項記載のDNAを含有する組換えベクター、

(8) 第(5)項記載のDNAまたは第(7)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、

(9) 第(8)項記載の形質転換体を培養することを特徴とする第(1)項記載のポリペプチドまたは第(4)項記載の部分ペプチドの製造法、

(10) 第(1)項記載のポリペプチドまたはそのアミ

ド、エステルもしくはその塩を含有してなる医薬、
 (11) 第(4)項記載の部分ペプチドまたはそのアミ
 ド、エステルもしくはその塩を含有してなる医薬、
 (12) 第(5)項記載のDNAを含有してなる医薬、
 (13) 下垂体機能調節剤である第(10)項、第(1
 1)項または第(12)項記載の医薬、
 (14) 中枢神経機能調節剤である第(10)項、第
 (11)項または第(12)項記載の医薬、
 (15) 膵臓機能調節剤である第(10)項、第(1
 1)項または第(12)項記載の医薬、
 (16) 第(1)項記載のポリペプチドまたは第(4)
 項記載の部分ペプチドに対する抗体、

(17) (1) 配列番号: 21で表されるアミノ酸配列
 と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する
 受容体蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩
 に、第(1)項記載のポリペプチドまたは第(4)項記
 載の部分ペプチドを接触させた場合と(ii) 配列番号:
 21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同
 一のアミノ酸配列を含有する受容体蛋白質もしくはその
 部分ペプチドまたはその塩に、第(1)項記載のポリペ
 プチドまたは第(4)項記載の部分ペプチド、および試
 験化合物を接触させた場合との比較を行うことを特徴と
 する第(1)項記載のポリペプチドまたは第(4)項記
 載の部分ペプチドと、配列番号: 21で表されるアミノ
 酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を
 含有する受容体蛋白質もしくはその部分ペプチドまた
 はその塩との結合性を变化させる化合物のスクリーニ
 グ方法、

(18) 第(1)項記載のポリペプチドまたは第(4)
 項記載の部分ペプチドと、配列番号: 21で表されるア
 ミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配
 列を含有する受容体蛋白質もしくはその部分ペプチド
 またはその塩との結合性を变化させる化合物のスクリー
 ニング用キット、

(19) 第(1)項記載のポリペプチドまたは第(4)
 項記載の部分ペプチドと、配列番号: 21で表されるア
 ミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配
 列を含有する受容体蛋白質もしくはその部分ペプチド
 またはその塩との結合性を变化させる化合物またはその塩、
 および

(20) 第(1)項記載のポリペプチドまたは第(4)
 項記載の部分ペプチドをリガンドとして認識するG蛋白
 質共役型レセプター蛋白質またはその塩に関する。

【0007】さらに、本発明は、

(21) ポリペプチドが、配列番号: 73で表わされる
 アミノ酸配列、配列番号: 73で表わされるアミノ酸配
 列中の1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個
 以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠
 失したアミノ酸配列、配列番号: 73で表わされるアミ
 ノ酸配列に1個以上80個以下、好ましくは1個以上5

0個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミ
 ノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号: 73で
 表わされるアミノ酸配列中の1個以上15個以下、好ま
 しくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5
 個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸
 配列を含有するペプチドである第(1)項記載のポリペ
 プチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩、

(22) 配列番号: 73で表されるアミノ酸配列を含有
 するポリペプチドのN末端にさらに配列番号: 74で表
 10 されるペプチドが付加したアミノ酸配列を含有するポリ
 ペプチドである第(1)項記載のポリペプチド、

(23) ウシ、ラットまたはヒト由来である第(1)項
 記載のポリペプチド、および

(24) 痴呆、鬱病、多動児(微細脳障害)症候群、意
 識障害、不安障害、精神分裂症、恐怖症、成長ホルモン
 分泌障害、過食症、多食症、高コレステロール血症、高
 グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、糖尿
 病、癌、肺炎、腎疾患、ターナー症候群、神経症、リウ
 マチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋萎縮性側
 20 索硬化症、急性心筋梗塞、脊髄小脳変性症、骨折、創
 傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、てんかん、不
 妊症または乳汁分泌不全などの疾病の治療・予防剤であ
 る第(10)項、第(11)項または第(12)項記載
 の医薬を提供するものである。

【0008】本発明におけるリガンドポリペプチドに対
 するG蛋白質共役型レセプター蛋白質に関して、具体的
 には、

(25) 配列番号: 19で表わされるアミノ酸配列と同
 一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列または(およ
 30 び) 配列番号: 20で表わされるアミノ酸配列と同一ま
 たは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴
 とする、第(20)項記載のG蛋白質共役型レセプター
 蛋白質またはその塩、

(26) 配列番号: 21で表わされるアミノ酸配列と同
 一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有すること
 を特徴とする第(25)項記載のG蛋白質共役型レセ
 プター蛋白質またはその塩、

(27) 配列番号: 22で表わされるアミノ酸配列と同
 一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有すること
 40 を特徴とする第(25)項記載のG蛋白質共役型レセ
 プター蛋白質またはその塩、

(28) 配列番号: 23で表わされるアミノ酸配列と同
 一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有すること
 を特徴とする第(25)項記載のG蛋白質共役型レセ
 プター蛋白質またはその塩、

(29) 第(25)項~第(28)項記載のいずれかの
 G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたは
 その塩、

50 【0009】(30) 第(25)項記載のG蛋白質共役
 型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDN

Aを含有するDNA、

(31) 第(26)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(32) 第(27)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(33) 第(28)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、

(34) 配列番号：24で表わされる塩基配列または(および)配列番号：25で表わされる塩基配列を有する第(30)項記載のDNA、

(35) 配列番号：26で表わされる塩基配列で表される塩基配列を有する第(31)項記載のDNA、

(36) 配列番号：27で表わされる塩基配列で表される塩基配列を有する第(32)項記載のDNA、

(37) 配列番号：28で表わされる塩基配列で表される塩基配列を有する第(33)項記載のDNA、

(38) 第(30)項～第(33)項記載のいずれかのDNAを含有する組換えベクター、

(39) 第(38)項記載の組換えベクターを保持する形質転換体、

(40) 第(39)項記載の形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜にG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする第(25)項～第(28)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造方法、および

(41) 第(25)項～第(28)項記載のいずれかのG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または第(29)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体を提供する。

【0010】さらに具体的には、

(42) 蛋白質が、(i) 配列番号：19で表わされるアミノ酸配列、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：19で表わされるアミノ酸配列に1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：19で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列または(および) (ii) 配列番号：20で表わされるアミノ酸配列、配列番号：20で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：20で表わされるアミノ酸配列に1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：20で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個

以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(25)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(43) 蛋白質が、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：21で表わされるアミノ酸配列に1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：21で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(26)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

(44) 蛋白質が、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：22で表わされるアミノ酸配列に1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：22で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(27)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、および

(45) 蛋白質が、配列番号：23で表わされるアミノ酸配列、配列番号：23で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：23で表わされるアミノ酸配列に1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：23で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(28)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に関する。本明細書において、「実質的に同一」とはタンパク質の活性、例えば、リガンドと受容体の結合活性、生理的な特性などが、実質的に同じことを意味する。アミノ酸の置換、欠失あるいは挿入はしばしばポリペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化をもたらさないが、こうした場合その置換、欠失あるいは挿入を施されたポリペプチドは、そうした置換、欠失あるいは挿入のされていないものと実質的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、たとえばそのアミノ酸が属するところのクラスのうち他のアミノ酸類から選ぶことができる。非極性(疎水性)アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。極性(中性)

アミノ酸としてはグリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。陽電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としてはアルギニン、リジン、ヒスチジンなどが挙げられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明のリガンドポリペプチドは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合することができる、配列番号：73で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくは該部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩が挙げられる。ここで、配列番号：73において第10番目のXaaはAlaまたはThr、第11番目のXaaはGlyまたはSer、第21番目のXaaはH、Gly、またはGlyArgを示す。本発明のリガンドポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩（以下、単にリガンドポリペプチドまたはポリペプチドと略称する場合がある）、その製造法および用途を以下にさらに詳細に説明する。本発明の上記リガンドポリペプチドとしては、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる組織（たとえば、下垂体、膵臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するポリペプチドであって、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであればよい。例えば、本発明のリガンドポリペプチドとしては、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列と約50～99.9%（好ましくは70～99.9%、より好ましくは80～99.9%、さらに好ましくは90～99.9%）の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばレセプター結合活性、シグナル伝達活性などが挙げられる。実質的に同質とは、レセプター結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、レセプター結合活性の強さなどの強弱、ポリペプチドの分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0012】さらに具体的には、本発明のリガンドポリペプチドとしては、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列を含有するラット全脳、ウシ視床下部またはヒト全脳由来のポリペプチドなどが挙げられる。また、本発明のリガンドポリペプチドとしては、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列中の1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列に1個以上80個以下、

好ましくは1個以上50個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号：73で表わされるアミノ酸配列中の1個以上15個以下、好ましくは1個以上10個以下、より好ましくは1個以上5個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどの実質的に同一のアミノ酸配列も挙げられる。配列番号：73で表されるアミノ酸配列を示せば、配列番号：8、9、10、50、51、52、64、65または66である。また、配列番号：73で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドとしては、具体的には配列番号：1、3、4、5、6、7、14、15、17、48、49、59、61、62または63で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどを挙げることができる。上記のうち好ましくは配列番号：73で表されるアミノ酸を含有するポリペプチド及び配列番号：73で表されるアミノ酸配列を含有するポリペプチドのN末端に配列番号：74で表されるペプチドがさらに付加したアミノ酸配列を含有するポリペプチドなどを挙げることができる。さらに、本発明のポリペプチドもしくは部分ペプチドには、GlnのN端側が生体内で切断され、該Glnがピログルタミン酸化したものなども含まれる。本明細書におけるペプチドはペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：73で表されるポリペプチドはC末端が通常カルボキシル基（COOH）またはカルボキシレート（COO）であるが、C末端がアミド（CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、n-プロピル、イソプロピルもしくはn-ブチルなどのC₁₋₄アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₅₋₆シクロアルキル基、フェニル、α-ナフチルなどのC₁₀アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル-C₁₋₄アルキル、もしくはα-ナフチルメチルなどのα-ナフチル-C₁₋₄アルキルなどのC₁₁₋₁₄アルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピパロイルオキシメチルエステルなどが挙げられる。配列番号：73で表されるポリペプチドがC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートを有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。本発明のリガンドポリペプチドとしては特にC末端がアミドであるペプチドが好ましい。なかでも、配列番号：5、8、17、50、61、64で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドのC末端がアミドであるポリペプチドが好ましい。本発明のポリペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容さ

れる酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のリガンドポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩は、ヒトや温血動物の組織または細胞からポリペプチドを精製する方法によって製造することもできるし、後述のポリペプチド合成法に準じて製造することもできる。また、後述するポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。ヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせてることにより精製分離することができる。

【0013】上記したように本発明のリガンドポリペプチドは、自体公知のポリペプチドの合成法に従って製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の〜に記載された方法が挙げられる。

M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチドを精製分離することができる。上記方法で得られるポリペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0014】ポリペプチドのアミド体は、アミド形成に適したペプチド合成用樹脂を用いることができる。その

ような樹脂としては例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドロリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンシルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドロリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするペプチドの配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、目的のポリペプチドを取得する。上記した保護されたアミノ酸を縮合させるには、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボシイミド類がよい。カルボシイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボシイミド、N-エチル-N'-(3-メチルアミノプロピル)カルボシイミドなどが挙げられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt）とともに保護されたアミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護されたアミノ酸の活性化を行ったのちに樹脂に添加することができる。保護されたアミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえばN,N'-ジメチルホルムアミド、N,N'-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃〜50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5-4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことにより縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーアミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンシルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセ

チル、フタリル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシ基の保護基としては、たとえば上記したC₁-アルキル基、C₂-シクロアルキル基、C₃-アラルキル基の他、2-アダマンチル、4-ニトロベンシル、4-メトキシベンシル、4-クロロベンシル、フェナシル基およびベンシロキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭素から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBz、1-(Cl₂-Bzl)、2-ニトロベンシル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホンル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bu^m、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。原料のカルボキシ基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応するリン酸アミドが挙げられる。

【0015】保護基の除去（脱離）方法としては、たとえばPd黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に-20℃～40℃の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファン、インドル保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理によ

る脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。ポリペプチドのアミド体を得る別の方法としては、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、 α -アミノ基の保護基を除いたカルボキシ末端側ペプチドと所望ペプチドからカルボキシ末端側を除いたアミノ末端側ペプチドの α -カルボキシ基の保護基のみを除去し、 α -アミノ基や側鎖官能基に上記したような適当な保護基を付けた保護ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要成分を凍結乾燥することで所望のポリペプチドのアミド体を得ることができる。ポリペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシ基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチドのアミド体と同様にして所望のポリペプチドのエステル体を得ることができる。

【0016】本発明のリガンドポリペプチドの部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩としては、上記した配列番号：73で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと同様の作用（下垂体機能調節作用、中枢神経機能調節作用または膀胱機能調節作用など）を有しているものであれば、どのようなペプチドであってもよい。このようなペプチドとしてはたとえば、上記した配列番号：73で表されるアミノ酸配列を有するペプチドから1ないし15個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。具体的には、配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第2番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第3番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第4番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第5番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第6番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第7番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第8番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第9番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド

チド、配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第10番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、■配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第11番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、■配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第12番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、■配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第13番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、■配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第14番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチド、■配列番号：73で表されるアミノ酸配列の第15番目から第21番目のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。さらに、配列番号：74で表されるアミノ酸配列を有するペプチドなども好ましい。リガンドポリペプチドまたは該部分ペプチドはさらに抗リガンドポリペプチド抗体の調製のための抗原として用いることができる。このような抗原としてのポリペプチドは上記したリガンドポリペプチドまたは該部分ペプチドの他に、上記リガンドポリペプチドのN末端ペプチド、C末端ペプチド、中央部分のペプチドが用いられ、より具体的にはたとえば配列番号：92、93、94で表される部分ペプチドが好ましく用いられる。部分ペプチドとしては、個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。本明細書における部分ペプチドもC末端がアミド（-CONH₂）またはエステル（-COOR）であってもよい。ここでエステル基の例としては上記したポリペプチドの場合と同様である。該部分ペプチドがC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレート基を有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているものも本発明の部分ペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば、上記したC末端のエステルなどが用いられる。本発明のリガンドポリペプチドまたはその部分ペプチドは、さらに、機能あるいは性質がよく知られているタンパク質との融合タンパク質であってもよい。本発明のリガンドポリペプチドの部分ペプチドの塩としては、前述のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。本発明のリガンドポリペプチドの部分ペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩は、上記したポリペプチドの場合と同様の合成法に従って、あるいは本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

【0017】本発明のリガンドポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、本発明の配列番号：73で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよ

い。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接RT-PCR法によって増幅することもできる。より具体的には、配列番号：1または配列番号：44のアミノ酸配列を含有するラット全脳あるいはウシ視床下部由来のポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。ここで、配列番号：2において第129番目のRはGまたはAを、第179番目および240番目のYはCまたはTを示す。第179番目のYがCのとき、配列番号：1で表されるアミノ酸配列をコードし、第179番目のYがTのとき、配列番号：44で表されるアミノ酸配列をコードする。また、配列番号：3、4、5、6、7、8、9または10で表されるアミノ酸配列を含有するウシ由来ポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：11、12、13、14、15、16、17または18で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。ここで、配列番号：11、13、14、15の第63番目のRおよび配列番号：12、16、17、18の第29番目のRはGあるいはAを示す。また、配列番号：45、47、48、49、50、51または52で表されるラット由来ポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：46、53、54、55、56、57または58で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。さらに、配列番号：59、61、62、63、64、65または66で表されるヒト由来ポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：60、67、68、69、70、71または72で表される塩基配列を有するDNAなどが用いられる。また、本発明の配列番号：1、配列番号：44で表されるアミノ酸配列を含有するウシ型ポリペプチド、配列番号：45で表されるアミノ酸配列を含有するラット型ポリペプチド、または配列番号：59で表されるアミノ酸配列を含有するヒト型ポリペプチドをコードするDNAの中で例えば6個以上90個以下（好ましくは6個以上60個以下、より好ましくは9個以上30個以下、さらに好ましくは12個以上30個以下）の部分塩基配列を含有するDNA断片はDNA検出プローブとしても好ましく用いられる。

【0018】本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAは以下の遺伝子工学的手法によっても製造することができる。本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドを完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、ポリペプチドまたはその部分ペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを例えばヒト由来ポリペプチドの一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーシ

ョンによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning (2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。クローン化されたポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。ポリペプチドまたはその部分ペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、

(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、 λ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

【0019】形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trp プロモーター、lac プロモーター、recAプロモーター、 λ P Lプロモーター、lpp プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどがそれぞれ利用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ポリペプチドまたはその部分ペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリファスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、ノイテイニングファクター α ・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配

列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして構築されたポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0020】宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレック・アシックス・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) M1114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

【0021】酵母としては、たとえばサッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr CHO細胞), マウスL細胞, マウスミエローマ細胞, ヒトFL細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行われる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行われる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行な

われる。

【0022】昆虫細胞を形質転換するには、たとえばバイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988) などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばウィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973) に記載の方法に従って行なわれる。このようにして、ポリペプチドまたはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸三水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。

【0023】エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3-β-インドリル・アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら, 「プロシーシングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)」や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら, 「プロシーシングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)」] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0024】宿主が昆虫である形質転換体を培養する

際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], D-MEM培地 [ウィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーシング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオリジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。

【0025】上記培養物からポリペプチドまたはその部分ペプチドを分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。ポリペプチドまたはその部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出する際には、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよびまたは凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドまたはその部分ペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100 (登録商標。以下、TMと省略することがある。) などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドまたはその部分ペプチドが分泌される場合には、培養終了後、自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液に含まれるポリペプチドまたはその部分ペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法やクロマトフォーカシングなどの等電点の差を利用する方法などが用いられる。かくして得られるポリペプチドまたはその部分ペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準

じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成するポリペプチドまたはその部分ペプチドの活性はレセプターとの結合実験および特異抗体を用いたエッセイ・免疫アッセイなどにより測定することができる。

【0026】本発明のリガンドポリペプチドをコードするDNA、リガンドポリペプチドまたは該部分ペプチドは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドの一部、あるいは全長の合成、本発明のリガンドポリペプチドまたは該部分ペプチドの有する生理作用の探索、合成オリゴヌクレオチドプローブあるいはPCRのプライマーの作成、G蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドや前駆体蛋白質をコードするDNAの入手、組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、抗体および抗血清の入手、該抗体または抗血清を用いた診断薬の開発、下垂体機能調節剤、中枢神経機能調節剤あるいは臓腑機能調節剤などの医薬の開発、遺伝子治療等に用いることができる。特に、後述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

【0027】さらに、上記に関し、本発明のリガンドポリペプチド、該部分ペプチド、またはそれをコードするDNAは下垂体、中枢神経系、膵臓β細胞などで発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質がリガンドとして認識するものであるため、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明のリガンドポリペプチド、該部分ペプチド、またはそれをコードするDNAは下垂体機能調節作用、中枢神経機能調節作用あるいは臓腑機能調節作用に関与していることから、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、感染性疾患（例：クロイツフェルト・ヤコブ病などの遅発ウイルス感染症など）に起因する痴呆、内分泌性・代謝性・中毒性疾患（例：甲状腺機能低下症、ビタミンB12欠乏症、アルコール中毒、各種薬剤・金属・有機化合物による中毒など）に起因する痴呆、腫瘍性疾患（例：脳腫瘍など）に起因する痴

呆、外傷性疾患（例：慢性硬膜下血腫など）に起因する痴呆などの痴呆、鬱病、多動児（微細脳障害）症候群、意識障害、不安障害、精神分裂症、恐怖症、成長ホルモン分泌障害（例：巨人症、末端肥大症など）、過食症、多食症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病、癌（例：乳癌、リンパ性白血病、膀胱癌、卵巣癌、前立腺癌など）、肺炎、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、ターナー症候群、神経症、リウマチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋萎縮性側索硬化症、急性心筋梗塞、脊髄小脳変性症、骨折、創傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、てんかん、不妊症または乳汁分泌不全などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。さらに手術後の栄養状態改善剤、昇圧剤などとしても用いることができる。本発明のポリペプチド、該部分ペプチド、またはそれをコードするDNAを上記の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0028】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばセラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモク油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-5

0)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンフルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物(例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど)に対して投与することができる。本発明のポリペプチド、該部分ペプチド、またはそれをコードするDNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形で通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01から30mg程度、好ましくは約0.1から20mg程度、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0029】上記本発明のリガンドポリペプチドに対するG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)のあらゆる組織(例えば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など)または細胞などに由来するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であって、配列番号:19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列と同一もしくはこれらのアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。すなわち、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、配列番号:19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列と約90~99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号:19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。これらの蛋白質が示す活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル伝達などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質

であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0030】さらに具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:19または(および)配列番号:20で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、配列番号:22で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス脾臓由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、配列番号:23で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス脾臓由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質などが挙げられる。そして、配列番号:19および配列番号:20で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、具体的には配列番号:21で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質などが挙げられる。また、G蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列中の1以上30個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号:19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列に1個以上30個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、配列番号:19、20、21、22または23で表わされるアミノ酸配列中の1個以上30個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども挙げられる。ここで、配列番号:21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質は、ヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の全アミノ酸配列を含有するものである。配列番号:19または(および)配列番号:20で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質は、該配列番号:21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質の断片あるいは部分ペプチドである。さらに、配列番号:22または配列番号:23で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質は、マウス脾臓由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるが、配列番号:19または(および)配列番号:20で表されるアミノ酸配列に非常に高い類似性を示す(実施例8、特に[図13])ことから、配列番号:22または23で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質も同様に、配列番号:21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質の断片あるいは部分ペプチドの中に含まれる。すなわち、上述の配列番号:21で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくは後述する該蛋白質の部分

ペプチドまたはその塩は、配列番号：19、20、22または23で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質またはその塩をも含むものである。さらに、G蛋白質共役型レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₈アシル基など）で保護されているもの、G1uのN端側が生体内で切断され、該G1uがピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₈アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

【0031】G蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩としては、上記したリガンドポリペプチドと同様のものが挙げられる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩または該部分ペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、前述のポリペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養する方法と同じ方法によっても製造することができる。また、前述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。具体的には、

〔図3〕、〔図4〕、〔図8〕、〔図11〕または〔図14〕で示される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、上記したリガンドポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

【0032】G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：19、20、21、22または23のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接RT-PCR法によって増幅することもできる。具体的には、配列番号：19のアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、

配列番号：24で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：20のアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：25で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：21のアミノ酸配列を含有するヒト下垂体由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：26で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：22のアミノ酸配列を含有するマウス脾臓由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：27で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。配列番号：23のアミノ酸配列を含有するマウス脾臓由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：28で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0033】G蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクローニングの方法、用い得るベクター、プロモーター、宿主、形質転換方法、培養方法、分離精製の方法については上記したリガンドポリペプチドの場合と同様である。たとえば、後述する実施例5で得られるプラスミドp hGR3を制限酵素SalIで消化し、hGR3をコードするcDNAの完全長の翻訳枠部分を取り出す。これを同じくSalI消化後に自己閉環を防止するためにBAP（Bacterial Alkaline Phosphatase）処理を施した動物細胞用発現ベクターpAKKO-111等とライゲーション反応を行う。ライゲーション反応完了後は反応液の一部を用いて大腸菌DH5等を形質転換する。得られた形質転換体のうち、hGR3をコードするcDNAが発現ベクターにあらかじめ組み込んであるSRαなどのプロモーターに対して順方向に挿入されているものを制限酵素切断によるマッピングあるいは塩基配列の決定によって選別しそのプラスミドDNAを大量に調製する。作成した発現ベクターのDNAを用い、リン酸カルシウム法あるいはリポソーム法などにもとづく動物細胞への遺伝子導入用のキットを用いてCHO dhfr細胞に導入してG蛋白質共役型レセプター蛋白質（hGR3）高発現CHO細胞株を得る。得られたCHO細胞を核酸不含の選択培地でCO₂インキュベーターで37℃、5%CO₂の条件下で1～4日培養することによりG蛋白質共役型レセプター蛋白質（hGR3）を産生させる。該CHO細胞からG蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいはその部分ペプチドに対する抗体を担体に架橋させて作製されたアフィニティークラムあるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを担体に架橋させたアフィニティークラムを用いてG蛋白質共役型レセプター蛋白質を分離精製する。

【0034】かくして生成するG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性は標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより

測定することができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAおよびG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、抗体および抗血清の入手、組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作成、遺伝子治療等に用いることができる。特に、組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。本発明のリガンドポリペプチドおよびそれに対するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、リガンドポリペプチドおよびG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAおよび抗体等の用途について、以下にさらに具体的に説明する。

【0035】(1) G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、該リガンドの製造法および用途

上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または該部分ペプチドもしくはその塩は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを探索または決定するための試薬として有用である。すなわち、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドと、試験化合物とを接触させることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0036】試験化合物としては、公知のリガンド(例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP(バソアクティブ・インテスチナル・アンチ・リレイテッド・ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 α および β -chemokine(IL-8、GRO α 、GRO β 、GRO γ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 α 、MIP-1 β 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテニン、TRH、パンクレアティクポリペプチド、ガラニンなど)の他に、例えばヒトや温血動物(例えば、マウス、

ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど)の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などをG蛋白質共役型レセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

【0037】具体的には、上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、細胞外pHの低下などを促進する活性または抑制する活性)を有する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を決定する方法を提供する。細胞刺激活性の測定としては上記した中でも特にアラキドン酸遊離を促進する活性または抑制する活性を測定するのが好ましい。

【0038】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する具体的な方法としては、標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定しすることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

【0039】試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pH

の低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とする方法を挙げることができる。リガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus; NPV)のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献[Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年]に記載の方法に従って行うことができる。

【0040】したがって、リガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよい。また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。リガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を

用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン(Kinematica社製)による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の画分には、画分遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による画分法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速(500rpm~3000rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~30000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0041】該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり 10^3 ~ 10^7 分子であるのが好ましく、 10^5 ~ 10^7 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の~の方法を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した試験化合物が必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識した試験化合物としては、 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識した上記の

試験化合物などが好適である。

【0042】具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法を行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10(望ましくはpH6~8)のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM(花王アトラス

社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやセラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSE、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml~10 mlの該レセプター溶液に、一定量(5000 cpm~50000 cpm)の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。全結合量(B)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B-NSB)が0 cpmを越える試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。

【0043】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の〜の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、細胞外pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォスホコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0044】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンド決定用キットは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜面分を含有するものである。リガンド決定用キットの

例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution(ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。孔径0.45 μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10⁴個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

標識試験化合物

市販の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの。適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

非標識試験化合物

標識化合物を同じものを100~1000倍濃い濃度に調製する。

【0045】2. 測定法

12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させた細胞を、測定用緩衝液1 mlで2回洗浄した後、190 μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

標識試験化合物を5 μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5 μl加えておく。

反応液を除去し、1 mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2 N NaOH-1% SDSで溶解し、4 mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定する。

【0046】(2) リガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記(1)の方法において、明らかにされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドポリペプチドが有する作用に応じて、リガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤としても使用することができる。例えば、生体内において、リガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用(下垂体機能調節作用、中枢神経機能調節作用あるいは臓器機能調節作用など)が期待できない患者がいる場合に、(イ)リガンドポリペプチ

ドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは(ロ)脳細胞などにリガンドポリペプチドもしくはG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植することなどによって、該患者の脳細胞におけるリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドポリペプチドの作用を十分に発揮させることができる。したがって、リガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性なリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。上記DNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、上記したリガンドポリペプチドもしくは該部分ペプチドをコードするDNAを医薬として使用する場合と同様の手段に従って実施することができる。

【0047】(3)リガンドポリペプチドに対するG蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量法本発明のリガンドポリペプチドはG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩や該レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩に対して結合性を有しているので、生体内におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または該レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩の濃度を感度良く定量することができる。この定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のリガンドポリペプチドと接触させることによって被検体中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩の濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下のまたはなどに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

【0048】(4)G蛋白質共役型レセプター蛋白質と、本発明のリガンドポリペプチド、該部分ペプチドまたはそれらのアミド、エステルもしくはそれら塩(以下、リガンドまたはリガンドポリペプチドと略称する場合がある。)との結合性を变化させる化合物のスクリーニング方法

G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩や該部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガ

ンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(即ちG蛋白質共役型レセプターアゴニスト)と該細胞刺激活性を有しない化合物(即ちG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト)などが含まれる。「リガンドとの結合性を变化させる」とは、リガンドとの結合を阻害する場合とリガンドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

【0049】すなわち、本発明は、(i)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または該レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のリガンドを接触させた場合と(ii)上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または該レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のリガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のリガンドと上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のスクリーニング方法においては、(i)上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該レセプター蛋白質の部分ペプチドに、本発明のリガンドポリペプチドを接触させた場合と(ii)上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該レセプター蛋白質の部分ペプチドに、本発明のリガンドポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該レセプター蛋白質の部分ペプチドに対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

【0050】本発明のスクリーニング方法は具体的には、
 標識した本発明のリガンドポリペプチドを、上記した
 G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または
 G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたは
 その塩に接触させた場合と、標識した本発明のリガンド
 ポリペプチドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセ
 プター蛋白質もしくはその塩またはG蛋白質共役型レセ
 プター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に接触させ
 た場合における、標識した本発明のリガンドポリペプチ
 ドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、
 または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を
 測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンドポ
 リペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合

性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

標識した本発明のリガンドポリペプチドを、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識した本発明のリガンドポリペプチドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した本発明のリガンドポリペプチドの該細胞または該膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

標識した本発明のリガンドポリペプチドを、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識した本発明のリガンドポリペプチドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した本発明のリガンドポリペプチドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0051】G蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化化する化合物（例えば、本発明のリガンドポリペプチド）をG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプターを活性化化する化合物および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、およびG蛋白質共役型レセプターを活性化化する化合物（例えば、本発明のリガンドポリペプチドなど）をG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプターを活性化化する化合物、および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に

接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法である。

【0052】G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜面分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要である。しかし、細胞、組織または細胞膜面分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難である。しかしながら、ヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いることによって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプターとの結合性を变化させる化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がG蛋白質共役型レセプターアゴニストかG蛋白質共役型レセプターアンタゴニストかを評価することができる。本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。まず、本発明のスクリーニング方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、上記のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜面分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられる。本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞あるいは該細胞膜面分を用いる場合、前述の調製法に従えばよい。

【0053】本発明のリガンドとG蛋白質共役型レセプターとの結合性を变化させる化合物をスクリーニングする前記のへを実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した本発明のリガンドポリペプチドが必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役

型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^3\text{S}]$ などで標識されたリガンドなどを利用することができる。具体的には、リガンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物のスクリーニングを行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、 $\text{pH} 4 \sim 10$ （望ましくは $\text{pH} 6 \sim 8$ ）のリン酸バッファー、トリス塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM（花王アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml \sim 10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm \sim 500000cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-6}\text{M} \sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は 0°C から 50°C 、望ましくは 4°C から 37°C で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ -カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ B_0 ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0054】本発明のリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物をスクリーニングする前記のへの方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することかできる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮

な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型の本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を有する細胞株（例えば、マウス脾臓 β 細胞株MIN6など）、前述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質発現細胞株などが望ましい。試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0055】本発明のリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分、および本発明のリガンドポリペプチドを含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。孔径 $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、 4°C で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

G蛋白質共役型レセプター標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、 37°C 、5% CO_2 、95% airで2日間培養したもの。

標識リガンド

市販の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^3\text{S}]$ などで標識したリガンド適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを 4°C あるいは -20°C にて保存し、用時に測定用緩衝液にて $1\mu\text{M}$ に希釈する。

リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）

を含むPBSで1mMとなるように溶解し、20℃で保存する。

【0056】2. 測定法

12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

10⁻³~10⁻¹⁰Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識リガンドを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに10⁻¹⁰Mのリガンドを5μl加えておく。

反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH+1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding（PMB）を次の式〔数1〕で求める。

【数1】

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

PMB: Percent Maximum Binding

B: 検体を加えた時の値

NSB: Non-specific Binding（非特異的結合量）

B₀: 最大結合量

【0057】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のリガンドポリペプチドとG蛋白質共役型レセプターとの結合を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物であり、具体的にはG蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるG蛋白質共役型レセプターアゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物（いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。該G蛋白質共役型レセプターアゴニストは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドポリペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。逆に、G蛋白質共役型レセプターアンタゴニストは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドポリペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。本発明のリガンドポリペプチドは下垂体機能調節作用、中枢神経機能調節作用または腺臓機能調節作用に関与していることから、上記したアゴニストあるいはアンタゴニストをたとえば老年性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピク病、ハンチントン

病など）に起因する痴呆、感染性疾患（例：クローンフェルトーヤコブ病などの遅発ウイルス感染症など）に起因する痴呆、内分泌性・代謝性・中毒性疾患（例：甲状腺機能低下症、ビタミンB12欠乏症、アルコール中毒、各種薬剤・金属・有機化合物による中毒など）に起因する痴呆、腫瘍性疾患（例：脳腫瘍など）に起因する痴呆、外傷性疾患（例：慢性硬膜下血腫など）に起因する痴呆などの痴呆、鬱病、多動児（微細脳障害）症候群、意識障害、不安障害、精神分裂症、恐怖症、成長ホルモン分泌障害（例：巨人症、末端肥大症など）、過食症、多食症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、低血糖症、下垂体機能低下症、下垂体性小人症、糖尿病（例：糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症など）、癌（例：乳癌、リンパ性白血病、膀胱癌、卵巣癌、前立腺癌など）、肺炎、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、ターナー症候群、神経症、リウマチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋萎縮性側索硬化症、急性心筋梗塞、脊髄小脳変性症、骨折、創傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、てんかん、不妊症または乳汁分泌不全などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。さらに催眠鎮静剤、手術後の栄養状態改善剤、昇圧剤、降圧剤などとしても用いることができる。

【0058】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上記の医薬として使用する場合、上記のリガンドポリペプチドを医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。

【0059】（5）本発明のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体または抗血清の製造

本発明のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。例えば、ポリクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

【0060】〔ポリクローナル抗体の作製〕上記抗原としてのペプチドもしくは蛋白質は、キャリア用蛋白と結合される。該キャリア用蛋白としては、例えば、牛チログロブリン、牛血清アルブミン、牛ガンマグロブリン、ヘモシアニン、フロイドの完全アジュバント（グイフコ社製）などがあげられる。該抗原としての蛋白質とキャリア用蛋白との結合には、公知の常套手段を用いて実施し得る。結合に用いる試薬としては、例えば、グルタルアルデヒド、水溶性カルボジイミドなどがあげられる。抗原としての蛋白質とキャリア用蛋白との

使用比は、約1対1ないし約1対10が適当であり、反応のpHは、中性付近、特に約6〜8前後が良好な結果を与える場合が多い。また、反応に要する時間は、約1〜12時間が良い場合が多いが、特に、約2〜6時間が適当である。このようにして作成された複合物は、常套手段で約0〜18℃前後で水に対して透析し、凍結して保存しても良いし、凍結乾燥して保存しても良い。ポリクローナル抗体を製造するためには、上記のようにして製造した免疫原を温血動物に接種される。上記抗体の製造に用いられる温血動物としては、例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、カチョウ、ウズラ）などが挙げられる。免疫原を、温血動物に接種する方法としては、動物に接種する免疫原は、抗体産生をする有効な量でよく、例えば、ウサギに1回1mgを1mlの生理食塩水およびフロイントの完全アジュバントで乳化して、背部ならびに後肢掌皮下に4週間おきに5回接種すると抗体を産生させる場合が多い。このようにして、温血動物中に形成された抗体を採取する方法としては、例えばウサギでは、通常最終接種後7日から12日の間に耳静脈から採取し、遠心分離して血清として得られる。得られた抗血清は、通常、各抗原ペプチドを保持させた担体を用いるアフィニティクロマトグラフィーで吸着した画分を回収することによりポリクローナル抗体を精製することができる。

【0061】また、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2〜6週毎に1回ずつ、計2〜10回程度行われる。用いられる温血動物としては、たとえばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

【0062】モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2〜5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化ポリペプチドまたは標識化G蛋白質共役型レセプターと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャ

ー (Nature), 256, 495 (1975)] に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2.0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1〜20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000〜PEG6000）が10〜80%程度の濃度で添加され、20〜40℃、好ましくは30〜37℃で1〜10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗リガンドポリペプチド抗体または抗G蛋白質共役型レセプター抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、たとえばリガンドポリペプチド抗原またはG蛋白質共役型レセプター抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗リガンドポリペプチドモノクローナル抗体または抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターを加え、固相に結合した抗リガンドポリペプチドモノクローナル抗体または抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗リガンドポリペプチドモノクローナル抗体または抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1〜20%、好ましくは10〜20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1〜10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、和光純薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20〜40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日〜3週間、好ましくは1週間〜2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗リガンドポリペプチド抗体価または抗G蛋白質共役型レセプター抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0063】（b）モノクローナル抗体の精製
抗リガンドポリペプチドモノクローナル抗体または抗G

蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。以上の（a）および（b）の方法に従って製造させる本発明のリガンドポリペプチド抗体またはG蛋白質共役型レセプター抗体は、それぞれリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターを特異的に認識することができるので、被検液中のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、（i）本発明のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターに反応する抗体と、被検液および、標識化リガンドポリペプチドまたは標識化G蛋白質共役型レセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化リガンドポリペプチドまたは標識化G蛋白質共役型レセプターの割合を測定することの特徴とする被検液中のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターの定量法、（ii）被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することの特徴とする被検液中のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターの定量法において、一方の抗体が、リガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体がリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターのC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターの定量法を提供する。

【0064】本発明のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターを認識するモノクローナル抗体

（以下、抗リガンドポリペプチド抗体または抗G蛋白質共役型レセプター抗体と称する場合がある）を用いてリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')₂、F a b'、あるいはF a b 画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えばリガンドポリペプチド量またはG蛋白質共役型レセプター量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリ

が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば¹²⁵I）、¹³¹I）、³H）、¹⁴C）などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えばβ-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンコ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレシセン、シチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

【0065】抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した抗リガンドポリペプチド抗体または抗G蛋白質共役型レセプター抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗リガンドポリペプチド抗体または標識化抗G蛋白質共役型レセプター抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法によるリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗リガンドポリペプチド抗体または抗G蛋白質共役型レセプター抗体はリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、リガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

【0066】本発明のリガンドポリペプチド抗体またはG蛋白質共役型レセプター抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あ

るいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B、F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B、F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0067】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてリガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY, Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))」(以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。以上のように、本発明のリガンドポリペプチド抗体またはG蛋白質共役型レセプター抗体を用いることによって、リガンドポリペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターを感度良く定量することができる。本明細書および図面において、塩基やアミ

ノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

【0068】

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
10 A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
20 ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
EIA	: エンザイムイムノアッセイ
GlyまたはG	: グリシン
AlaまたはA	: アラニン
ValまたはV	: バリ
LeuまたはL	: ロイシン
IleまたはI	: イソロイシン
SerまたはS	: セリン
30 【0069】	
ThrまたはT	: スレオニン
CysまたはC	: システイン
MetまたはM	: メチオニン
GluまたはE	: グルタミン酸
AspまたはD	: アスパラギン酸
LysまたはK	: リジン
ArgまたはR	: アルギニン
HisまたはH	: ヒスチジン
PheまたはF	: フェニルアラニン
40 TyrまたはY	: チロシン
TrpまたはW	: トリプトファン
ProまたはP	: プロリン
AsnまたはN	: アスパラギン
GlnまたはQ	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
50 TC	: チアゾリジン-4(R) カルボキ

サミド基

【0070】また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

BHA: ベンズヒドリルアミン

pMBHA: p-メチルベンズヒドリルアミン

Tos: p-トルエンスルフォニル

CHO: ホルミル

HONB: N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド

OCHex: シクロヘキシルエステル

Bzl: ベンジル

Bom: ベンシルオキシメチル

Br-Z: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル

Boc: t-ブチルオキシカルボニル

DCM: ジクロロメタン

HOBt: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール

DCC: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

TFA: トリフルオロ酢酸

DEA: ジイソプロピルエチルアミン

Fmoc: N-(9-フルオレニル)メトキシカルボニル

DNP: ジニトロフェニル

Bum: ターシャリープトキシメチル

Trt: トリチル

【0071】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号: 1〕pBOV3に含まれるウシ視床下部由来リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

〔配列番号: 2〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドcDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号: 3〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドを精製し、P-3画分のN末端配列分析をした結果得られたアミノ酸配列を示す。配列番号: 1の第23~51番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号: 4〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドを精製、P-2画分のN末端配列分析をした結果得られたアミノ酸配列を示す。配列番号: 1の第34~52番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号: 5〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号: 1の第23~53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号: 6〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号: 1の第23~54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号: 7〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号: 1の第23~55番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号: 8〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号: 1の第34~53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号: 9〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチ

ドのアミノ酸配列を示す。配列番号: 1の第34~54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号: 10〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号: 1の第34~55番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号: 11〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド(配列番号: 3)をコードするDNAの塩基配列を示す。

10 〔配列番号: 12〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド(配列番号: 4)をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号: 13〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド(配列番号: 5)をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号: 14〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド(配列番号: 6)をコードするDNAの塩基配列を示す。

20 〔配列番号: 15〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド(配列番号: 7)をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号: 16〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド(配列番号: 8)をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号: 17〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド(配列番号: 9)をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号: 18〕ウシ視床下部由来リガンドポリペプチド(配列番号: 10)をコードするDNAの塩基配列を示す。

30 〔配列番号: 19〕p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号: 20〕p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。

40 〔配列番号: 21〕phGR3に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAにコードされるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

〔配列番号: 22〕pG3-2およびpG1-10にそれぞれ含まれるマウス膵臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列から導きだした塩基配列(配列番号: 27)を有するマウス膵臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされるマウス膵臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。

50 〔配列番号: 23〕p5S38にコードされるマウス膵

臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：24〕p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕phGR3に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕pG3-2およびpG1-10にそれぞれ含まれるマウス膵臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列をもとに導き出したマウス膵臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕p5S38に含まれるマウス膵臓β細胞株MIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：30〕G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：31〕G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：32〕G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：33〕G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：34〕G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

〔配列番号：35〕本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (P5-1)

〔配列番号：36〕本発明のウシ視床下部由来ポリリガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (P3-1)

〔配列番号：37〕本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (P3-2)

〔配列番号：38〕本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (PE)

〔配列番号：39〕本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (PDN)

〔配列番号：40〕本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (FB)

〔配列番号：41〕本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (FC)

10 〔配列番号：42〕本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (BOVF)

〔配列番号：43〕本発明のウシ視床下部由来リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA (BOVR)

〔配列番号：44〕ウシゲノム由来リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：45〕pRAV3に含まれるラット型リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

20 〔配列番号：46〕ラット型リガンドポリペプチドcDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号：47〕ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第22～52番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：48〕ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第22～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：49〕ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第22～54番目のアミノ酸配列に対応している。

30 〔配列番号：50〕ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第33～52番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：51〕ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第33～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：52〕ラット型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：45の第33～54番目のアミノ酸配列に対応している。

40 〔配列番号：53〕ラット型リガンドポリペプチド(配列番号：47)をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：54〕ラット型リガンドポリペプチド(配列番号：48)をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：55〕ラット型リガンドポリペプチド(配列番号：49)をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：56〕ラット型リガンドポリペプチド(配列番号：50)をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：57〕ラット型リガンドポリペプチド(配列番号：51)をコードするDNAの塩基配列を示す。

50 〔配列番号：58〕ラット型リガンドポリペプチド(配

列番号：52) をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：59〕 pHOB7に含まれるヒト型リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：60〕 ヒト型リガンドポリペプチドcDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号：61〕 ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第23～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：62〕 ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第23～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：63〕 ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第23～55番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：64〕 ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第34～53番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：65〕 ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第34～54番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：66〕 ヒト型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。配列番号：59の第34～55番目のアミノ酸配列に対応している。

〔配列番号：67〕 ヒト型リガンドポリペプチド(配列番号：61) をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：68〕 ヒト型リガンドポリペプチド(配列番号：62) をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：69〕 ヒト型リガンドポリペプチド(配列番号：63) をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：70〕 ヒト型リガンドポリペプチド(配列番号：64) をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：71〕 ヒト型リガンドポリペプチド(配列番号：65) をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：72〕 ヒト型リガンドポリペプチド(配列番号：66) をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：73〕 本発明のリガンドポリペプチドのアミノ酸配列を示す。ここで、第10番目のXaaはAlaまたはThr、第11番目のXaaはGlyまたはSer、第21番目のXaaはIle、Gly、またはGlyArgを示す。

〔配列番号：74〕 本発明のリガンドポリペプチド断片のアミノ酸配列を示す。ここで、第3番目のXaaはAlaまたはThrを示し、第5番目のXaaはGlnまたはArgを示し、第10番目のXaaはIleまたはThrを示す。

〔配列番号：75〕 本発明のラット型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(RA)

〔配列番号：76〕 本発明のラット型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(RC)

〔配列番号：77〕 本発明のラット型リガンドポリペ

チドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(rF)

〔配列番号：78〕 本発明のラット型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(rR)

〔配列番号：79〕 本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(R1)

〔配列番号：80〕 本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(R3)

〔配列番号：81〕 本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(R4)

〔配列番号：82〕 本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(HA)

〔配列番号：83〕 本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(HB)

〔配列番号：84〕 本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(HE)

〔配列番号：85〕 本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(HF)

〔配列番号：86〕 本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(5H)

〔配列番号：87〕 本発明のヒト型リガンドポリペプチドをコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(3HN)

〔配列番号：88〕 ラット型G蛋白質共役型レセプター蛋白質(UHR-1)をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(rRECF)

〔配列番号：89〕 ラット型G蛋白質共役型レセプター蛋白質(UHR-1)をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA(rRECR)

〔配列番号：90〕 G3PDH, UHR-1, リガンドの増幅に使用した合成DNA(r19F)

〔配列番号：91〕 G3PDH, UHR-1, リガンドの増幅に使用した合成DNA(r19R)

〔配列番号：92〕 抗原として使用したリガンドポリペプチドのN末端側ペプチド(ペプチド-I)

〔配列番号：93〕 抗原として使用したリガンドポリペプチドのC末端側ペプチド(ペプチド-II)

〔配列番号：94〕 抗原として使用したリガンドポリペプチドの中央部分のペプチド(ペプチド-III)

〔配列番号：95〕 ラット型G蛋白質共役型レセプター蛋白質(UHR-1)をコードするcDNAのスクリー

ニングに使用した合成DNA

【配列番号：96】ラット型G蛋白質共役型レセプター蛋白質（UHR-1）をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA

【0072】後述の実施例2で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) INV α F' / p19P2および実施例4で得られた形質転換体エシェリヒアコリ (*Escherichia coli*) INV α F' / pG3-2は、それぞれ平成6年8月9日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）にそれぞれ寄託番号FERM BP-4776およびFERM BP-4775として寄託されており、また平成6年8月22日から財団法人発酵研究所（IFO）にそれぞれIFO 15739およびIFO 15740として寄託されている。後述の実施例5で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 / pHGR3は、平成6年9月27日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-4807として寄託されており、また平成6年9月22日から財団法人発酵研究所（IFO）にIFO 15748として寄託されている。後述の実施例8で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 / p5S38は、平成6年10月27日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-4856として寄託されており、また平成6年10月25日から財団法人発酵研究所（IFO）にIFO 15754として寄託されている。後述の実施例20で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 / pBOV3は、平成8年2月13日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-5391として寄託されており、また平成8年1月25日から財団法人発酵研究所（IFO）にIFO 15910として寄託されている。後述の実施例29で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 / pRAV3は、平成8年9月12日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-5665として寄託されており、また平成8年9月3日から財団法人発酵研究所（IFO）にIFO 16012として寄託されている。後述の実施例32で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109 / pHOV7は、平成8年9月12日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に寄託番号FERM BP-5666として寄託されており、また平成8年9月5日から財団法人発酵研究所（IFO）にIFO 16013として寄託されている。

【0073】

【実施例】以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものでは

ない。

【0074】

【参考例1】G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅させるための合成DNAプライマーの製造

公知のヒト由来TRHレセプター蛋白質（HTRHR）、ヒト由来RANTESレセプター蛋白質（L10918、HUMRANTES）、ヒトパーキットリンパ腫由来リガンド不明レセプター蛋白質（X68149、HSBLR1A）、ヒト由来ゾマトスタチンレセプター蛋白質（L14856、HUMSOMAT）、ラット由来 μ -オピオイドレセプター蛋白質（U02083、RNU02083）、ラット由来 κ -オピオイドレセプター蛋白質（U00442、U00442）、ヒト由来ニューロメジンBレセプター蛋白質（M73482、HUMNMBR）、ヒト由来ムスカリン作動性アセチルコリンレセプター蛋白質（X15266、HSHM4）、ラット由来アドレナリン α_1 Bレセプター蛋白質（L08609、RATAADRE01）、ヒト由来ゾマトスタチン3レセプター蛋白質（M96738、HUMSTR3X）、ヒト由来C δ aレセプター蛋白質（HUMC5AAR）、ヒト由来リガンド不明レセプター蛋白質（HUMRDC1A）、ヒト由来リガンド不明レセプター蛋白質（M84605、HUMOP1ODRE）およびラット由来アドレナリン α_2 B（M91466、RATA2BAR）の第1膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。

【0075】また、公知のマウス由来リガンド不明レセプター蛋白質（M80481、MUSGIR）、ヒト由来ボンベジンレセプター蛋白質（L08893、HUMBOMB3S）、ヒト由来アデノシンA2レセプター蛋白質（S46950、S46950）、マウス由来リガンド不明レセプター蛋白質（D21061、MUSGPCR）、マウス由来TRHレセプター蛋白質（S43387、S43387）、ラット由来ニューロメジンKレセプター蛋白質（J05189、RATNEURA）、ラット由来アデノシンA1レセプター蛋白質（M69045、RATA1ARA）、ヒト由来ニューロキニンAレセプター蛋白質（M57414、HUMNEKA）、ラット由来アデノシンA3レセプター蛋白質（M94152、RATADENREC）、ヒト由来ゾマトスタチン1レセプター蛋白質（M81829、HUMSR11A）、ヒト由来ニューロキニン3レセプター蛋白質（S86390、S86371S4）、ラット由来リガンド不明レセプター蛋白質（X61496、RNCGPCR）、ヒト由来ゾマトスタチン4レセプター蛋白質（L07061、HUMSTR4Z）およびラット由来GnRHレセプター蛋白質（M31670、RATGNRHA）の第6膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコー

ドする cDNA の塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。

【0076】上記の () 内の略語はDNASIS Gene/Protein シークエンスデータベース (CD019、日立ソフトウェアエンジニアリング) を用いて GenBank/EMBL Data Bank を検索した際に示される整理番号であり、それぞれ通常 Accession Number およびエントリーネームと呼ばれるものである。ただし、HTRHR は特開平 7-304797 号に記載されている配列である。特に、多くのレセプター蛋白質をコードする cDNA で一致する塩基部分を基準とし、その他の部分においてもなるべく多くのレセプター cDNA と配列の一致性を高めるために混合塩基の導入を計画した。この配列をもとに、共通する塩基配列に相補的である配列番号: 29 または配列番号: 30 で表わされる塩基配列を有する合成 DNA 2 本を作成した。

【合成 DNA】5'-CGTGG (G または C) C (A または C) T (G または C) (G または C) TGGGC AAC (A、G、C または T) (C または T) CCTG-3' (配列番号: 29)

5'-GT (A、G、C または T) G (A または T) (A または G) (A または G) GGCA (A、G、C または T) CCAGCAGA (G または T) GGCAAA-3' (配列番号: 30)

() 内は合成時に複数の塩基に混合して合成する。

【0077】

【実施例 1】ヒト下垂体由来 cDNA を用いた PCR 法による受容体 cDNA の増幅

ヒト下垂体由来 cDNA (QuickClone、クロンテック社) を鋳型として用い、参考例 1 で合成した DNA プライマーを用いて PCR 法による増幅を行った。反応液の組成は、合成 DNA プライマー (配列: 5' プライマー配列および 3' プライマー配列) 各 1 μ M、鋳型 cDNA 1 ng、0.25 mM dNTPs、Taq DNA polymerase 1 μ l および酵素に付属のバッファーで、総反応溶液量は 100 μ l とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社) を用い、95 $^{\circ}$ C \cdot 1分、55 $^{\circ}$ C \cdot 1分、72 $^{\circ}$ C \cdot 1分のサイクルを 30 回繰り返した。Taq DNA polymerase を添加する前に、残りの反応液を混合し、95 $^{\circ}$ C \cdot 5分、65 $^{\circ}$ C \cdot 5分の加熱を行った。増幅産物の確認は 1.2% アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色によって行った。

【0078】

【実施例 2】PCR 産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入 cDNA 部分の塩基配列の解読による新規レセプター蛋白質候補クローンの選択 実施例 1 で行った PCR 後の反応産物は 0.8% の低融点アガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分のカミゾリ

で切り出した後、熱融解、フェノール抽出、エタノール沈殿を行って DNA を回収した。TA クローニングキット (インビトロゲン社) の処方に従い、回収した DNA をプラスミドベクター pCRTMII (TM は登録商標を意味する) ヘサブクローニングした。これを大腸菌 INV α F' competent cell (インビトロゲン社) に導入して形質転換したのち、cDNA 挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよび X-gal を含む LB 寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli) INV α F' p19P2 を得た。個々のクローンをアンピシリンを含む LB 培地で一晩培養し、自動プラスミド抽出装置 (クラボウ社) を用いてプラスミド DNA を調製した。調製した DNA の一部を用いて EcoRI による切断を行い、挿入されている cDNA 断片の大きさを確認した。残りの DNA の一部をさらに RNase 処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI 社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の情報は DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用いて行った。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。決定した塩基配列 [配列番号: 24 (図 1 の塩基配列から下線部分を除いた塩基配列) および配列番号: 25 (図 2 の塩基配列から下線部分を除いた塩基配列)] をもとにホモロジー検索を行なった結果、形質転換体 E. Coli INV α F' p19P2 の保有するプラスミド p19P2 に挿入された cDNA 断片が新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。それをさらに確認するために、DNASIS (日立システムエンジニアリング社) を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した [配列番号: 19 (図 1 のアミノ酸配列から下線部分を除いたアミノ酸配列) および配列番号: 20 (図 2 のアミノ酸配列から下線部分を除いたアミノ酸配列)]。疎水性プロット [図 3 および図 4] およびアミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行ない、ニューロペプチド Y 受容体等との相同性を見いだした [図 5]。

【0079】

【実施例 3】マウス脾臓 β 細胞株 MIN6 からの poly(A)⁺RNA 画分の調製および cDNA の合成
マウス脾臓 β 細胞株 MIN6 (Jun-ichi Miyazaki et al. Endocrinology, Vol. 127, No. 1, p126-132) よりグアニジンイソチオシアネート法により Total RNA を調製後 (Kaplan B.B. et al., Biochem. J. 183, 181-184 (1979)), mRNA 精製キット (ファルマシア社) を用いて、poly(A)⁺RNA 画分を調製した。次に、poly(A)⁺RNA 画分 5 μ g にプライマーとしてランダム DNA ヘキサマー (BRL 社) を加え、モロニイマウス白

血病ウイルスの逆転写酵素 (BRL社) により、添付パ
ンファアを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物
はフェノール:クロロホルム (1:1) で抽出し、エタ
ノール沈殿を行った後、30 μ l のTEに溶解した。

【0080】

【実施例4】MIN6由来cDNAを用いたPCR法に
よる受容体cDNAの増幅と塩基配列の決定

実施例3でマウス膵 β 細胞株MIN6より調製したcD
NA 5 μ l を鋳型として使用し、参考例1で合成した
DNAプライマーを用いて実施例1と同条件でPCR法
を行った。得られたPCR産物は実施例2に記載の方法
と同様にして、プラスミドベクターpCRTMIIにサブク
ローニングし、プラスミドpG3-2を得た。このプラ
スミドで大腸菌INV α F'を形質転換し、形質転換体
エシエリヒア コリ (Escherichia coli) INV α F'
にpG3-2を得た。また、マウス膵 β 細胞株MIN6
より調製したcDNA 5 μ l を鋳型として使用し、Lib
ert, Fら (Science 244:569-572, 1989) に記載されて
いる合成DNAプライマー、すなわち、5'-CTGT
G (CまたはT) G (CまたはT) (GまたはC) AT
(CまたはT) GCIT (GまたはT) GA (Cまた
はT) (AまたはC) G (GまたはC) TAC-3'

(配列番号: 3

1)

[Iはイノシンを示す。] で表される合成プライマーお
よび5'-A (GまたはT) G (AまたはT) AG (A
またはT) AGGGCAGCCAGCAGA I (Gまた
はC) (AまたはG) (CまたはT) GAA-3' (配
列番号: 32)

[Iをイノシンを示す。] で表される合成プライマーを
用いて、実施例1と同条件でPCR法を行った。得られ
たPCR産物は実施例2に記載の方法と同様にして、プ
ラスミドベクターpCRTMIIにサブクローニングし、プ
ラスミドpG1-10を得た。

【0081】塩基配列の決定のための反応は DyeDeoxy
Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社) を用い
て行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得ら
れた塩基配列の情報はDNASIS (日立システムエン
지니어リング社) を用いて行った。pG3-2およびp
G1-10の配列をもとにマウス膵 β 細胞株MIN6由
来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDN
Aの塩基配列 (配列番号: 27) およびこれにコードさ
れるアミノ酸配列 (配列番号: 22) を [図6] に示し
た。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分
である。決定した塩基配列 [図6] をもとにホモロジー
検索を行なった結果、得られたcDNA断片が新規G蛋
白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かっ
た。それをさらに確認するために、DNASIS (日立
システムエンジニアリング社) を用い、塩基配列をアミ
ノ酸配列に変換した後 [図6]、疎水性プロットを行な

ったところ、6個の疎水性領域の存在が確認できた [図
8]。また、アミノ酸配列を実施例2で得たp19P2
と比較したところ、[図7] に示すとおり高い相同性を
見いだした。その結果、pG3-2およびpG1-10
にコードされるマウス膵 β 細胞株MIN6由来G蛋白質
共役型レセプター蛋白質とヒト下垂体由来p19P2に
コードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質は由来す
る動物種は異なるが、同一のリガンドを認識するレセ
プター蛋白質であることが強く示唆された。

【0082】

【実施例5】ヒト下垂体由来cDNAライブラリーから
のレセプター蛋白質の全コード領域を含むcDNAのク
ローニング

ヒト下垂体由来cDNAライブラリーとしては、クロ
ンテック社製の λ gt11ファージベクターを使ったラ
イブラリーを用いた (クロンテック、CLHL113
9b)。2 \times 10⁶ p.f.u. (ブランク・フォーミング・
ユニット) 分のヒト下垂体cDNAライブラリーを、硫
酸マグネシウムで処理した大腸菌Y1090と混ぜ、
37℃、15分間インキュベートした後、0.5%アガ
ロース (ファルマシア社) LBを加え、1.5%寒天
(和光純薬社) LBプレート (50 μ g/ml Ampicilin含
有) に播いた。ブランクのできたプレートにニトロセル
ロースフィルターを置き、フィルター上にブランクを転
写した。このフィルターをアルカリ処理することによ
って変性させた後、80℃、3時間の加熱によってDNA
の固定を行った。このフィルターを、50% formamid
e, 5 \times SSPE, 5 \times Denhardt's溶液, 0.1% SD
S, 100 μ g/ml salmon sperm DNAを含むパンファ
ア中で以下に述べるプローブと42℃で一晩インキュベ
ートし、ハイブリダイズさせた。プローブとしては、実
施例2で得られたプラスミドp19P2に挿入されたD
NA断片をEcoRIで切断し、回収後、ランダムプラ
イムDNAラベリングキット (アマシャム社) を用いて
[³²P] dCTP (デュボン社) を取り込ませることによ
って標識して用いた。洗浄は、2 \times SSC, 0.1%
SDSで55℃、1時間行い、その後、-80℃でオー
トララジオグラフィを行ってハイブリダイズするブランク
を検出した。

【0083】このスクリーニングにより、3個の独立し
たブランクにハイブリダイゼーションのシグナルが認め
られた。この3個のクローンからそれぞれDNAを調製
し、EcoRIで消化したものをアガロース電気泳動
後、スクリーニングに用いたものと同じプローブを用い
て、サザンブロットにより解析を行ったところ、各々約
0.7 kb, 0.8 kb, 2.0 kbのところにそれぞれ
ハイブリダイズするバンドを生じ、このうち約2.0 k
bのバンドを生じるもの (λ hGR3) を選択した。 λ
hGR3のハイブリダイズするサイズのEcoRI断片
をプラスミドpUC18のEcoRIサイトにサブクロ

ーニングした後、このプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、形質転換体 *E. coli* JM109/p hGR3を得た。このプラスミドp hGR3を、実施例2で示された塩基配列から予想される制限酵素地図をもとにして制限酵素地図を作製したところ、実施例2で示されるレセプター蛋白質をコードするDNAから予想されるレセプター蛋白質の全長をコードするDNAを保持していることが分かった。

【0084】

【実施例6】 ヒト下垂体由来レセプター蛋白質cDNAの塩基配列の決定

実施例5で得られたプラスミドp hGR3に挿入したEcoRI断片のうち、レセプター蛋白質をコードしていると考えられるEcoRIサイトからNheIサイトまでの約1330bpの塩基配列を決定した。具体的には、EcoRI断片中に存在する制限酵素サイトを利用して、不必要な部分を除き、または必要な断片をサブクローニングし、配列解析のための鋳型プラスミドを調製した。塩基配列決定のための反応はDye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用いて行い、蛍光式DNAシーケンサー (ABI社)を用いて解読し、データ解析にはDNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング社)を使用した。p hGR3のコードするEcoRIサイト直後からNheIサイトまでの塩基配列を〔図9〕に示した。そして、ヒト下垂体由来レセプタータンパク質をコードするDNAの塩基配列は、

〔図9〕の塩基配列の第118番目～第1227番目の塩基配列 (配列番号: 26) に対応する。そして、これにコードされるレセプター蛋白質のアミノ酸配列は配列番号: 21で表わされるアミノ酸配列であることが分かった。

【0085】

【実施例7】 ヒト下垂体由来レセプター蛋白質をコードするp hGR3を用いたノーザンハイブリダイゼーション

実施例5で得られたプラスミドp hGR3にコードされるヒト下垂体由来レセプター蛋白質の下垂体での発現をmRNAレベルで検出するため、ノーザンプロットを行った。mRNAとしてはヒト下垂体mRNA (クローンテック社) 2.5μgを用い、プローブは実施例5で用いたものと同じものを用いた。また、ノーザンプロット用のフィルターは、Nylon membrane (Pall Biodyne, U. S. A.)を用い、mRNAの泳動フィルターへの吸い上げはMolecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)の方法に従って作製した。ハイブリダイゼーションは、上に述べたフィルターとプローブを50% formamide, 5×SSPE, 5×Denhardt's溶液, 0.1% SDS, 100μg/ml salmon sperm DNAを含むバッファー中で、42℃・晩インキュベートした。フィルターの洗浄は0.1×SSC, 0.1% SDSで5

0℃にて行い、風乾後3日間-80℃でX線フィルム (XAR 5, コダック) に感光させた。その結果を〔図10〕に示した。〔図10〕から、p hGR3がコードするレセプター遺伝子はヒト下垂体で発現していると考えられる。

【0086】

【実施例8】 MIN6由来cDNAを用いたPCR法による受容体cDNAの増幅と塩基配列の決定

実施例3でマウス膵β細胞株MIN6より調製したcDNA 5μlを鋳型として使用し、実施例4で合成したLibert, F.ら (Science 244:569-572, 1989) に記載されている合成DNAプライマー、すなわち、5'-CTGTG (CまたはT) G (CまたはT) (GまたはC) AT (CまたはT) GCIT (GまたはT) GA (CまたはT) (AまたはC) G (GまたはC) TAC-3' (配列番号: 3

1)

〔Iはイノシンを示す。〕で表される合成プライマーおよび5'-A (GまたはT) G (AまたはT) AG (AまたはT) AGGGCAGCCAGCAGA I (GまたはC) (AまたはG) (CまたはT) GAA-3' (配列番号: 32)

〔Iをイノシンを示す。〕で表される合成プライマーを用いて、実施例1と同条件でPCR法を行った。得られたPCR産物は実施例2に記載の方法と同様にして、プラスミドベクターpCR^{III}にサブクローニングし、プラスミドp5S38を得た。このプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、形質転換体エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) JM109/p5S38を得た。

【0087】 塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の情報はDNASIS (日立システムエンジニアリング社)を用いて行った。p5S38の配列をもとにマウス膵β細胞株MIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列 (配列番号: 28) およびこれにコードされるアミノ酸配列 (配列番号: 23) を〔図12〕に示した。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。決定した塩基配列〔図12〕をもとにホモロジー検索を行なった結果、得られたcDNA断片が新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。それをさらに確認するために、DNASIS (日立システムエンジニアリング社)を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後〔図12〕、疎水性プロットを行なったところ、4個の疎水性領域の存在が確認できた〔図14〕。

また、アミノ酸配列を実施例2で得たp19P2および実施例4で得たpG3-2と比較したところ、〔図13〕に示すとおり高い相同性を見いだした。その結果、p5S38にコードされるマウス膵β細胞株MIN6由

来G蛋白質共役型レセプター蛋白質とp19P2にコードされるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、由来する動物種は異なるが、同一のリガンドを認識するレセプター蛋白質であることが強く示唆された。また、p5S38にコードされるマウス脾β細胞株M1N6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質とpG3-2およびpG1-10にコードされるマウス脾β細胞株M1N6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、同一のリガンドを認識するレセプター蛋白質であり、互いに近縁なレセプター蛋白質（いわゆる、サブタイプ）であることが示唆された。

【0088】

【実施例9】p hGR3発現CHO細胞の作製

ヒト下垂体由来レセプター蛋白質の全長アミノ酸配列をコードするcDNAを組み込んだプラスミドp hGR3（実施例5）を制限酵素Nco Iで切断し、アガロースゲル電気泳動後に約1kbの断片を回収した。回収した断片の両端をDNA blunting kit（宝酒造）を用いて平滑化した後、Sal Iリンカーを付加しさらにSal Iで処理した後、pUC119のSal I siteに組み込んでプラスミドS10を得た。S10をSal IおよびSac IIで処理することにより約700bpの断片（N末端側のコード領域を含む）を調製した。次にp hGR3よりSac IIおよびNhe Iで切り出される約700bpの断片（終始コドンを含むC末端側コード領域を含む）を調製した。これらの2つの断片をSal IおよびNhe I処理した動物細胞発現用ベクタープラスミドp AKKO-111H（Biochim. Biophys. Acta, Hinuma, S., et al. 1219巻、251-259頁、1994年記載のpAKO1.11Hと同一のベクタープラスミド）に加えてligationを行い全長レセプター蛋白質発現用プラスミドp AKKO-19P2を構築した。p AKKO-19P2で形質転換した大腸菌を培養後、QIAGEN Maxiによって大量にp AKKO-19P2のプラスミドDNAを調製した。そのうち20μgのプラスミドDNAを1mlの滅菌PBSに溶解した後、シーントランスファー（和光純薬）のバイアルに入れ、十分にボルテックスを行うことによってリポソームの形成を行わせた。24時間前に直径10cmシャーレに1×10⁶個ずつ継代し、直前に新鮮な培地に交換したCHOdhfr細胞に125μlのリポソーム溶液を添加し、一晚培養した。新鮮な培地に交換してさらに一日培養した後、選択培地に交換して1日間培養した。形質転換体を効率良く選別するために、低細胞密度で継代を行い、選択培地中で増殖してくる細胞のみを選択し、全長レセプター蛋白質発現CHO細胞株 CHO-19P2を樹立した。

【0089】

【実施例10】CHO-19P2細胞株での全長レセプター蛋白質の発現量の転写レベルでの確認

Fast Track kit（Invitrogen社）を用い、キットの処方にしたがってp AKKO-19P2を導入して形質転換

したCHO細胞とmock CHO細胞からpoly(A)⁺RNAを調製した。このpoly(A)⁺RNAを0.02μg用い、RNA PCR Kit（宝酒造）を用いてcDNAの合成を行った。用いたプライマーの種類はrandom 9merで、反応液の全容量は40μlとした。また、cDNA合成のネガティブコントロールとして、リバーシトランスクリプターゼを添加しない反応液も準備した。最初、30℃で10分間のインキュベーションを行ってプライマーからの伸長反応をある程度行わせた。その後、42℃で30分間インキュベーションして十分に逆転写反応を進行させ、99℃で5分間加熱して酵素を失活し、さらに5℃で5分間冷却した。逆転写反応終了後に反応液の一部を回収し、蒸留水で希釈した後、フェノール・クロロホルム抽出、シエチルエーテル抽出を行った。これをエタノール沈殿し、一定量の蒸留水に溶解したものをcDNAの試料とした。このcDNA溶液およびプラスミドDNA（p AKKO-19P2）を段階的に希釈したものを作成し、全長レセプター蛋白質に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。全長レセプター蛋白質のコード領域の塩基配列に基づいて作成したプライマーの配列は、5'側がCTGACTTATTTTCTGGGCTGCCGC（配列番号：33）、3'側がAACACCGACACATAGACGGTGACC（配列番号：34）である。PCR反応は、プライマー各1μMおよびTaq DNA polymerase（宝酒造）0.5μl、酵素に添付の反応バッファーおよびdNTPsと10μlの鋳型DNA（cDNAあるいはプラスミド溶液）を用いて全容量100μlで行った。最初に94℃で2分間熱処理を行って鋳型DNAの変性を十分に行った後に、95℃で30秒、65℃で30秒、72℃で60秒のサイクルを25回行った。反応終了後に10μlの反応液を用いてアガロースゲル電気泳動を行い増幅産物の検出および量的な比較を行った。その結果全長レセプター蛋白質をコードするcDNAの配列から推定される大きさ（400bp）のPCR産物が、検出された〔図15〕。リバーシトランスクリプターゼを添加しなかった逆転写反応産物を鋳型として用いたPCR反応液のレーンに特異的なバンドは検出されず、CHO細胞のゲノムDNA由来のPCR産物である可能性は除外され、また、mock細胞のレーンにも特異的なバンドが出現しないことから、CHO細胞にもとから発現しているmRNA由来ではないことが確認された〔図15〕。

【0090】

【実施例11】ラット全脳抽出液に含まれるCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性の検出

ラット全脳よりベグチド粗画分を以下の方法で調整した。屠殺後、直ちに摘出したラット全脳を液体窒素にて凍結、-80℃にて保存した。凍結保存したラット全脳20g（ラット10匹分）を細かく砕き、蒸留水80mlで10分間煮沸した。煮沸後、氷上にて急冷し、終濃度1.0Mとなるよ

う酢酸を4.7ml加え、ポリトロン(20,000rpm、6min)を用いてホモジナイズした。ホモジェネートは、一晚攪拌した後、遠心(10,000rpm、20min)により上清をとり、沈殿物を1.0M酢酸40mlでホモジナイズし遠心にて再度上清を得た。上清をまとめ、3倍量のアセトンを加え、氷上に30分間放置した後遠心(10,000rpm、20min)にて上清を回収した。回収したアセトン上清は、エバポレーションにて脱アセトン、濃縮を行った。濃縮された脱アセトン上清に、2倍量の0.05%トリフルオロ酢酸(TFA)/H₂Oを加え、ガラス製カラムに詰めた逆相C18カラム(Prep C18 125 Å 10ml:ミリポア)に添加した。上清を添加後、0.05%TFA/H₂O でカラムを洗浄、10%、20%、30%、40%、50%、60% CH₃CN/0.05%TFA/H₂O で段階的に溶出し、それぞれの画分を10等分して凍結乾燥した。1匹分の全脳由来の乾燥標品を、ジメチルスルホキシド(DMSO)20 μ lにて溶解し、0.05%ウシ血清アルブミン(BSA)を加えたハンクス氏液(HBSS)1mlに懸濁し、ペプチド粗画分とした。全長レセプター蛋白質発現CHO細胞およびmock CHO細胞を、24well plateに0.5x10⁶cells/wellで播種し、24時間培養後、³Hアラキドン酸を0.25 μ Ci/wellとなるよう添加した。³Hアラキドン酸添加16時間後、細胞を0.05%BSAを含むHBSSで洗浄、上述のペプチド粗画分を400 μ l/wellで添加した。37℃で30分間インキュベートした後に、反応液400 μ l中300 μ lをシンチレーター4mlに加え、反応液中に遊離された³Hアラキドン酸代謝物の量をシンチレーション・カウンターによりモニターした。その結果、30%CH₃CNの溶出画分に全長レセプター蛋白質発現CHO細胞(CHO-19P2)特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性が検出された〔図16〕。

【0091】

【実施例12】ウシ視床下部抽出液に含まれるCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性の検出

実施例11と同様の方法でウシ視床下部を含む脳組織片360g(10頭分)よりペプチド粗画分を調製した。0.5頭分由来の乾燥ペプチド標品を40 μ lのDMSOに溶解し、0.05%BSAを含む2mlのHBSSに懸濁し、実施例11と同様の方法でアラキドン酸代謝物遊離活性の検出を試みた。その結果、ウシ視床下部ペプチド粗画分のC18カラム30%CH₃CN溶出画分に、CHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された〔図17〕。

【0092】

【実施例13】ウシ視床下部からのCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性物質(ペプチド)の精製

CHO-19P2細胞株から特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性物質についてウシ視床下部から精製した代表例を以下に具体的に述べる。視床下部を含む凍結脳組織片4.0kg(80頭分)を小片化し、蒸留水8.0L中

で20分間煮沸した。氷上にて急冷した後、終濃度1.0Mとなるように酢酸540mlを加え、ポリトロン(10,000rpm、12min)にてホモジナイズした。ホモジェネートを一晚攪拌した後、遠心(9,500rpm、20min)にて上清を得た。沈殿物は1.0M酢酸4.0Lに懸濁し、ポリトロンにてホモジナイズし遠心にて再度上清を得た。上清を一つにまとめ、終濃度0.05%となるようにTFAを加え、ガラス製カラムに詰めた逆相C18カラム(PrepC18 125 Å 160ml:ミリポア)に添加した。添加後、0.05%TFA/H₂O 320ml でカラムを洗浄後、10%、30%、50% CH₃CN/0.05%TFA/H₂O で3段階に溶出した。30% CH₃CN/0.05%TFA/H₂O 溶出画分に2倍量の20mM CH₃COONH₄/H₂Oを加え、陽イオン交換カラム HiPrep CM-Sepharose FF (Pharmacia)に添加した。20mM CH₃COONH₄/10% CH₃CN/H₂O でカラムを洗浄後、100mM、200mM、500mM、1000mM CH₃COONH₄/10%CH₃CN/H₂O で4段階に溶出した。200mM CH₃COONH₄ 溶出画分にCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が見いだされたので、この溶出画分に3倍量のアセトンを加え、遠心して除タンパク質を行った後、エバポレーションによる濃縮を行った。濃縮された画分にTFA(終濃度0.1%)を加えた後さらに酢酸を加えてpH4に調製し、逆相カラム RESOURCE RPC 3ml(Pharmacia)に添加した。15% 30% CH₃CN 濃度勾配による溶出で、19%-21% CH₃CN の画分にCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された。RESOURCE RPC の活性画分を凍結乾燥後、DMSOで溶解したのち、50mM MES pH5.0/10% CH₃CN に懸濁し、陽イオン交換カラム RESOURCE S 1ml(Pharmacia)に添加した。0M-0.7M NaCl 濃度勾配による溶出で、0.32M-0.46M NaCl の画分にCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された。RESOURCE S の活性画分を凍結乾燥後、DMSOに溶解したのち、0.1%TFA/H₂O に懸濁し、逆相カラム C18 218TP5415(Vydac)に添加した。20%-30% CH₃CN 濃度勾配による溶出で、22.5%、23%、23.5% CH₃CN の3つの画分(活性画分をそれぞれP-1、P-2、P-3とする)にそれぞれCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された〔図18〕。3つに分離した活性のうちの23.5% CH₃CN の画分(p-3)を凍結乾燥後、DMSOで溶解したのち、0.1%TFA/H₂O に懸濁し、逆相カラム diphenyl 219TP5415(Vydac)に添加した。22%-25% CH₃CN 濃度勾配による溶出で、23% CH₃CN で溶出される1つのピークにCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性は収束した〔図19〕。逆相カラムdiphenyl 219TP5415で活性と一致したピークの画分を凍結乾燥後、0.1%TFA/H₂O に懸濁し、逆相カラム μ RPC C2/C18 SC 2.1/10(Pharmacia)に添加した。22%-23.5% CH₃CN 濃度勾配による溶出で23.0%と23.2% CH₃CN で溶出される二つのピークにそれぞれCHO-19P2細胞株から特異的にア

ラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された〔図20〕。

【0093】

【実施例14】ウシ視床下部から精製したCHO-19 P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性ペプチドのアミノ酸配列決定

実施例13で精製されたCHO-19 P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性ペプチド(P-3)のアミノ酸配列の決定を行った。逆相カラム μ RPC C2/C18 SC 2.1/10 で活性と一致したピークの画分を凍結乾燥後、70% CH₃CN 20 μ l に溶解し、ペプチドシーケンサー(ABI, 491) によるアミノ酸配列の分析を行った。その結果、配列番号: 3 が得られた。ただし、7番目と19番目の配列はアミノ酸配列の分析のみでは決定されていない。

【0094】

【実施例15】ウシ視床下部からのCHO-19 P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性物質(ペプチド)の精製

実施例13において Vydac C18 218 TP 5415 で分離された3つの活性のうち23.0% CH₃CNの活性画分(P-2)のさらなる精製を行った。この活性画分を凍結乾燥後、DMSOで溶解したのち0.1% TFA / 蒸留水に懸濁し、逆相カラムdiphenyl 219 TP 5415 (Vydac) に添加した。21.0% - 24.0% CH₃CN濃度勾配による溶出で、21.9% CH₃CNで溶出される一つのピークにCHO-19 P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が検出された。この画分を凍結乾燥後、DMSOで溶解したのち0.1% TFA / 蒸留水に懸濁し、逆相カラム μ RPC C2/C18 SC 2.1/10 (Pharmacia) に添加した。21.5% - 23.0% CH₃CN濃度勾配による溶出で、22.0% CH₃CNで溶出される一つのピークにCHO-19 P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が収束した〔図21〕。

【0095】

【実施例16】ウシ視床下部から精製されたCHO-19 P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進するペプチド(P-2)のアミノ酸配列決定

実施例15で精製されたCHO-19 P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進するペプチド(P-2)のアミノ酸配列の決定を行った。逆相カラム μ RPC C2/C18 SC 2.1/10 で活性と一致したピークの画分を凍結乾燥後、70% CH₃CN 20 μ l に溶解し、ペプチドシーケンサー(ABI, 492) によるアミノ酸配列の分析を行った(配列番号: 4)。

【0096】

【実施例17】ウシ視床下部からの poly(A)⁺RNA 画分の調製および cDNA の合成

ウシ1頭分の視床下部より Isogen (ニッポンジーン社) により total RNA を調製後、FastTrack (Invitrogen社) を用いて poly(A)⁺RNA 画分を調製した。次にこの poly(A)⁺RNA 画分 1 μ g から、3' RACE system (GIBCO BRL) および Marathon cDNA amplification kit (Clontech) により、マニュアルに従って cDNA を合成し、それぞれ 20 および 10 μ l に溶解した。

【0097】

10 【実施例18】実施例14で明らかとなったアミノ酸配列部分をコードする cDNA の取得

実施例14で明らかとなったアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする cDNA を取得するため、まず配列番号: 1 をコードする塩基配列の取得をめざした。そこでプライマー P5-1 (配列番号: 35)、P3-1 (配列番号: 36)、P3-2 (配列番号: 37) を合成した(配列表において I はイノシンを示す)。実施例17で 3' RACE system を用いて調製した cDNA 0.5 μ l を鋳型として、DNA polymerase として EX Taq (宝酒造) を用い、添付のバッファー 2.5 μ l、dNTP 200 μ M と、プライマー P5-1、P3-1 をそれぞれ 200 nM となるように加水で 25 μ l とし、94°C・1分後、98°C・10秒、50°C・30秒、68°C・10秒のサイクルを 30 回繰り返した。この反応液をトリシン・EDTA バッファーで 50 倍に希釈したもの 2.5 μ l を鋳型として、プライマーを P5-1 と P3-2 に組み合わせに換え、その他は同じ条件で反応を行った。サーマルサイクラーは GeneAmp9600 (パーキンエルマー社) を用いた。増幅産物を 4% アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約 70 bp のバンドを切り出し、熱融解、フェノール抽出、エタノール沈殿した。回収した DNA を TA クローニングキット (Invitrogen) のマニュアルに従い、プラスミドベクター pCRTMIIへサブクローニングした。これを大腸菌 JM109 に導入して、得られた形質転換体をアンピシリンを含む LB 培地で培養後、自動プラスミド抽出器(クラボウ)でプラスミドを調製した。このプラスミドを Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI) でマニュアルに従い反応し、蛍光自動DNAシーケンサー(ABI)により解読した。その結果〔図22〕に示す配列が得られ、これが配列番号: 1 をコードする塩基配列の一部であることを確認した。

【0098】

【実施例19】実施例18で明らかになった配列を用いての RACE 法による生理活性ポリペプチド cDNA の取得

まず 5' 側の配列を増幅する (5' RACE) のために〔図22〕に示した配列を利用して PE (配列番号: 38) と PDN (配列番号: 39) の 2 本のプライマーを合成した。実施例17で Marathon cDNA amplification

kit により調製した cDNA をトリシン・EDTA バッファーで 100 倍に希釈したもの 2.5 μ l を鋳型として、実施例 2 と同様の方法で反応液を調製し、キット添付のアダプタープライマー AP1 と PE の組み合わせで、9.4℃・1 分後、9.8℃・10 秒、6.8℃・5 分のサイクルを 30 回繰り返した。さらにこの反応液をトリシン・EDTA バッファーで 50 倍に希釈したもの 2.5 μ l を鋳型として、プライマーを AP1 と PDN の組み合わせに換え、9.4℃・1 分後、9.8℃・10 秒、7.2℃・5 分のサイクルを 4 回、9.8℃・10 秒、7.0℃・5 分のサイクルを 4 回、9.8℃・10 秒、6.8℃・5 分のサイクルを 26 回繰り返した。増幅産物を 1.2% アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約 150 bp のバンドを切り出し、遠心濾過チューブ（ミリポア社）で遠心濾過後、フェノール抽出、エタノール沈殿した。回収した DNA を TA クローニングキット（Invitrogen）のマニュアルに従い、プラスミドベクター pCRTMII-ヘサブクロニングした。これを大腸菌 JM109 に導入して、得られた形質転換体を実施例 18 と同様の方法で挿入された cDNA 断片の配列を解析した。その結果、[図 2.3] に示す配列が得られた。さらにこの配列を基にプライマー FB（配列番号：40）、FC（配列番号：41）を合成し、3' 側の配列取得を行った（3' RACE）。鋳型は 5' RACE と同じものを同量用い、キット添付のアダプタープライマー AP1 と FC の組み合わせで、9.4℃・1 分後、9.8℃・10 秒、7.2℃・5 分のサイクルを 5 回、9.8℃・10 秒、7.0℃・5 分のサイクルを 5 回、9.8℃・10 秒、6.8℃・5 分のサイクルを 25 回繰り返した。さらにこの反応液をトリシン・EDTA バッファーで 50 倍に希釈したもの 2.5 μ l を鋳型として、プライマーを、やはりキット添付の AP2 と FB の組み合わせに換え、9.4℃・1 分後、9.8℃・10 秒、7.2℃・5 分のサイクルを 4 回、9.8℃・10 秒、7.0℃・5 分のサイクルを 4 回、9.8℃・10 秒、6.8℃・5 分のサイクルを 27 回繰り返した。増幅産物を 1.2% アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約 400 bp のバンドを切り出し、5' RACE のときと同様の方法で DNA を回収した。この DNA 断片をプラスミドベクター pCRTMII-ヘサブクロニング後、大腸菌 JM109 に導入して、得られた形質転換体に挿入された cDNA 断片の配列を解析した。5' および 3' RACE の結果から、配列番号：1 に示した生理活性ポリペプチドの全コード領域をコードする cDNA 配列 [図 2.4] を得た。具体的には、図 2.4 (a) および (b) において、第 134 番目の塩基が G のものであって、第 184 番目の塩基が T および C のもの、第 245 番目の塩基が T および C のものが得られた。図 2.4 に示した cDNA は 98 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしていた。第 1 から第 22 番目のアミノ酸が疎水的なアミノ酸が集合して

いることと実施例 1.4 に示したように活性ペプチドの N 末端が第 23 番目の Ser から始まっていることを考え合わせると、第 1 から 22 番目のアミノ酸は分泌シグナルの配列であると推定された。一方、ポリペプチドの第 54 番目から 57 番目に存在する GlyArgArgArg 配列は生理活性ペプチドが切断される場合に存在する典型的なアミノ酸配列モチーフであることが分かった。またこの切断モチーフの場合には Gly が存在するためしばしば生成するペプチドの C 末端はアミド化されることが知られている。実施例 1.4 の P-3 の N 末端配列および実施例 1.6 の P-2 の N 末端配列情報とこの GlyArgArgArg 配列を考え合わせるとこの cDNA にコードされるポリペプチドから切り出されてくる生理活性ペプチドの少なくとも一部は配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：9 もしくは配列番号：10 であると考えられた。

【0099】

【実施例 20】PCR 法によるウシ型生理活性ポリペプチド cDNA の全コード領域を含む DNA 断片の取得
実施例 17 で Marathon cDNA amplification kit により調製した cDNA を鋳型として生理活性ポリペプチド cDNA の全コード領域を含む DNA 断片の取得を行った。まず実施例 19 で明らかとなった cDNA の配列を基に、配列番号：42、配列番号：43 で表される塩基配列を有するプライマーを 2 本合成した。

BOVF
5'-GTGTCGACGAATGAAGGCGGTGG
GGGCCCTGGC-3'

(配列番号：42)

30 BOVR (24mer)
5'-AGGCTCCCGCTGTTATTCCTGGA
C-3' (配列番号：43)

BOVF は生理活性ポリペプチド cDNA のスタートコドンを含み、制限酵素 Sma I 部位を付加した +2 ~ +22 (スタートコドン ATG の A を +1 とする) に対応するセンス配列で、BOVR は生理活性ポリペプチド cDNA のストップコドンを含む +285 ~ +309 に対応するアンチセンス配列である。PCR 反応は実施例 17 で Marathon cDNA amplification kit により調製した cDNA をトリシン・EDTA バッファーで 100 倍に希釈したもの 2.5 μ l を鋳型として、実施例 2 と同様の方法で反応液を調製し、9.4℃・1 分後、9.8℃・10 秒、7.2℃・5 分のサイクルを 3 回、9.8℃・10 秒、7.0℃・5 分のサイクルを 3 回、9.8℃・10 秒、6.8℃・5 分のサイクルを 27 回繰り返した。増幅産物を 2% アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約 320 bp のバンドを切り出し、実施例 3 と同様の方法で DNA を回収、プラスミドベクター pCRTMII-ヘサブクロニングした。これを大腸菌 JM109 に導入して、形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia c

oli) JM109/pBOV3を得た。得られた形質転換体に挿入されたcDNA断片の配列を解析した。その結果このDNA断片は生理活性ポリペプチドcDNAの全コード領域を含む断片であることが確認された。

【0100】

【実施例21】 Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂ (19P2-L31) の合成。

1) Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Ala-His(Bom)-Gln-His(Bom)-Ser(Bzl)-Met-Glu(OcHex)-Ile-Arg(Tos)-Thr(Bzl)-Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(Tos)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resinの合成。

市販p-メチルBHA樹脂(アブライドバイオシテムズ、現パーキンエルマー社製) 0.71g(0.5 mmole)をペプチド合成機(アブライドバイオシテムズ社製430A)の反応器に入れ、DCMで膨潤させた後、最初のアミノ酸Boc-PheをHOBt/DCC法で活性化しp-メチルBHA樹脂に導入した。樹脂を50%TFA/DCMで処理し、Boc基を除去してアミノ基を遊離させ、DIEAで中和した。このアミノ基に次のアミノ酸Boc-Arg(Tos)をHOBt/DCC法で縮合した。未反応アミノ基の有無をニンヒドリンテストで調べ反応完了を確認後同様に、Boc-Gly, Boc-Val, Boc-Pro, Boc-Arg(Tos), Boc-Ile, Boc-Gly, Boc-Arg(Tos), Boc-Gly, Boc-Ala, Boc-Tyr(Br-Z)を順次縮合、ニンヒドリンテストで縮合が不十分であると判明したBoc-Ala, Boc-Tyr(Br-Z)は再縮合し反応を完了した。樹脂を乾燥して半量の樹脂を取り出した残りに、Boc-Trp(CHO), Boc-Ala, Boc-Pro, Boc-Asn, Boc-Ile, Boc-Asp(OcHex), Boc-

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

【0101】

【実施例22】 Ser-Arg-Ala-His-Gln-His-Ser-Met(O)-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂ (19P2-L31 (O)) の合成。

合成19P2-L31 6mgを5%-酢酸水溶液20 ※

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA水)

B液 (0.1% TFA含有50%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (25分)

流速: 1.0 ml/分

【0102】

【実施例23】 Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr

* Pro, Boc-Thr(Bzl), Boc-Arg(Tos), Boc-Ile, Boc-Glu(OcHex), Boc-Met, Boc-Ser(Bzl), Boc-His(Bom), Boc-Gln, Boc-His(Bom), Boc-Ala, Boc-Arg(Tos), Boc-Ser(Bzl)を同様にニンヒドリンテストで十分な縮合が得られるまで再縮合をくり返した。19P2-L31の全配列アミノ酸が導入され樹脂を50%TFA/DCMで処理し樹脂上のBoc基を除去後、樹脂を乾燥し1.28gのペプチド樹脂を合成した。

2) Ser-Arg-Ala-His-Glu-His-Ser-Met-Glu-Ile-Arg-Thr-Pro-Asp-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp-Tyr-Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH₂ (19P2-L31) の合成。

1) で得た樹脂をp-クレゾール3.8g、1,4-ブタンジチオール1ml、弗化水素10mlと共にテフロン製弗化水素反応装置中で0℃ 60分間反応した。弗化水素、1,4-ブタンジチオール1mlを減圧留去し、残留物にジエチルエーテル100mlを加え攪拌後、ガラスフィルター上に濾取、乾燥した。これを50%酢酸水溶液50ml中に懸濁、攪拌し、ペプチドを抽出した後樹脂と分離し減圧下に約50mlまでに濃縮した後、セファデックスG-25 (2 x 90 cm) のカラムに付し50%酢酸水で展開し114 ml~181 mlの画分を集め凍結乾燥し、19P2-L31を含む白色粉末290 mgを得た。これをLiChroprep RP-18 (MERCK社製)を充填した逆相系カラムにつけ0.1% TFA水と0.1% TFA含有30%アセトニトリル水溶液を用いたグラジエント溶出での精製をくり返し、アセトニトリル濃度25%前後に溶出される部分を集め凍結乾燥し、白色粉末71mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 3574, 645

* 30 HPLC溶出時間 18.2分

※ mlに溶解し30%-過酸化水素水40 μlを加えMet部分のみを酸化し、反応終了後直ちにLiChroprep RP-18 (MERCK社製)を充填した逆相系カラムにつけて精製し目的物 5.8mgをえた。

質量分析による (M+H)⁺ 3590, 531

HPLC溶出時間 17.9分

★ Ala-Gly-Arg-Gly-Ile-Arg-Pro-Val-Gly-Arg-Phe-NH

★ 50 (19P2-L20) の合成。

実施例21の1)でBoc-Tyr(Br-Z)までを縮合した樹脂にさらにBoc-Trp(CHO)、Boc-Ala、Boc-Pro、Boc-Asn、Boc-Ile、Boc-Asp(OcHex)、Boc-Pro、Boc-Thr(Bzl)を同様に縮合し、Boc-Thr(Bzl)-Pro-Asp(OcHex)-Ile-Asn-Pro-Ala-Trp(CHO)-Tyr(Br-Z)-Ala-Gly-Arg(Tos)-Gly-Ile-Arg(To

カラム条件

カラム: Wakosil 5C18 (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液 (0.1% TFA含有15%アセトニトリル水)

B液 (0.1% TFA含有45%アセトニトリル水) を用い

A液からB液へ直線型濃度勾配溶出 (15分)

流速: 1.0 ml/分

【0103】

【実施例24】合成ペプチド(19P2-L31)によるアラキドン酸代謝物遊離活性の測定

実施例11と同様に、実施例21で合成されたペプチド(19P2-L31)によるCHO-19P2細胞株からの特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を測定した。合成ペプチドは、脱気処理した蒸留水に 1.0×10^{-4} Mの濃度で溶解し、0.05%BSAを含むHBSSで希釈して、それぞれの濃度におけるCHO-19P2細胞株からのアラキドン酸代謝物の遊離を ^3H -アラキドン酸代謝物の量を指標に測定した。その結果、 1.0×10^{-4} Mで濃度依存的なアラキドン酸代謝物遊離の活性が検出された〔図25〕。さらに、実施例22で合成された19P2-L31のメチオニン酸化体であるペプチド19P2-L31(O)について19P2-L31とのアラキドン酸代謝物遊離活性の比較を行った結果、〔図26〕に示すように19P2-L31(O)は19P2-L31と同等の活性を示すことが分かった。

【0104】

【実施例25】合成ペプチド(19P2-L20)によるアラキドン酸代謝物遊離活性の測定

実施例11と同様に、実施例23で合成された天然品P-2に相当するペプチド(19P2-L20)によるCHO-19P2細胞株からの特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を測定した。合成ペプチドは、脱気処理した蒸留水に 1.0×10^{-4} Mの濃度で溶解し、0.05%BSAを含むHBSSで希釈して、それぞれの濃度におけるCHO-19P2細胞株からのアラキドン酸代謝物の遊離を ^3H -アラキドン酸代謝物の量を指標に測定した。その結果、 1.0×10^{-4} ~ 1.0×10^{-6} Mで濃度依存的なアラキドン酸代謝物遊離の活性が19P2-L31とほぼ同程度に検出された〔図27〕。

【0105】

【実施例26】ウシゲノムDNAにおけるコード領域の塩基配列の解析

pBOV3を制限酵素EcoRIで消化し、アガロースゲル電気泳動で分離した後、cDNA断片部分のDNAを回収してプローブを調製した。これをマルチプライムDNAラベリングキット(アマシャム社)を用いて ^{32}P 標識した。クローニ

*s)-Pro-Val-Gly-Arg(Tos)-Phe-pMBHA-resin1. 1.4gを得た。これを実施例21の2)と同様に弗化水素処理、カラム精製し、白色粉末60mgを得た。

質量分析による(M+H) $^{+}$ 2242.149

* HPLC溶出時間 10.4分

※ゲノムベクターEMBL3 SP6/T7を用いて構築したBovine Genomic Library (CLONTECH社 BL1015j)の約 2.0×10^6 個のファージを大腸菌K802を宿主としてLB寒天培地プレートに播種し、一晚培養してプラークを形成させた。これをニトロセルロースフィルターに転写し、アルカリ変性、中和処理を行った後、熱処理(80°C、2時間)によってDNAを固定化した。このフィルターを50%ホルムアミドを含むハイブリゾマックス(50%formamide、5x Denhardt's溶液、4x SSPE、0.1mg/ml Salmon sperm DNA、0.1%SDS)中で標識プローブと42°Cで一晚インキュベーションし、ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後のフィルターを室温で2x SSC、0.1%SDS中で15時間洗浄した後、さらに55°Cの同バッファー中で30分間洗浄した。プローブとハイブリダイズするクローンの検出は、コダック社のX線フィルム(X-OMATTMAR)と増感スクリーンを用い、80°Cで1日間の露光によって行った。X線フィルムを現像した後、フィルムとプレートの位置を対応させながらハイブリダイズしている部分のファージを回収した。さらに上記の方法によって再プレーティングとハイブリダイゼーションを繰り返して行い、ファージのクローン化を行った。クローン化したファージをプレートライセート法によって大量に調製し、ファージDNAを抽出した後、ベクターのクローニングサイトの両端に存在する制限酵素SalIおよびBamHI切断部位で切断してウシゲノムDNA由来の挿入断片の検出を1.2%アガロースゲル電気泳動によって行った〔図28〕。その結果、BamHI消化では3本の断片がファージ由来のバンドの他に検出された。また、SalI消化ではファージ由来のバンドに重なって1本のバンドが検出された。SalI消化断片が全長を保持していると考え、この断片をプラスミドベクターにサブクローニングするために、SalI消化後にBAP(大腸菌由来のアルカリフォスファターゼ)処理したプラスミドベクターpUC18(ファルマシア社)とライゲーション反応を行い、大腸菌JM109に導入した。この菌からゲノム由来のSalI断片が挿入されたプラスミドDNAを大量に調製し、パーキンエルマー・アプライドバイオシステムズ社の370A蛍光式シーケンサーおよび同社のキットを用いてコード領域付近の塩基配列の解析を行った。その結果、〔図29〕に示す

ような配列が得られた。cDNAのコード領域と比較すると、ゲノムDNA由来であるために472bpのイントロンによってコード領域が2つに分割されている〔図30〕。〔図31〕および配列番号：44には、このウシのゲノムのコード領域（イントロン部分を除いたもの）から推定されるアミノ酸配列を示す。

【0106】

【実施例27】ラット延髄背側部poly(A)⁺RNA画分の調製およびcDNAの合成
ラットの延髄背側部よりIsogen（ニッポンジーン社）によりtotal RNAを調製後、FastTrack（Invitrogen社）を用いてpoly(A)⁺RNA画分を調製した。次にこのpoly(A)⁺RNA 5μgにプライマーとしてランダムDNAヘキサマー（BRL社）を加え、モロニーマウス白血病の逆転写酵素（BRL社）により、添付バッファーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はエタノール沈殿を行った後、12μlの蒸留水に溶解した。またこのpoly(A)⁺RNA 1μgから、Marathon cDNA amplification kit（Clontech）により、マニュアルに従ってcDNAを合成し、10μlに溶解した。

【0107】

【実施例28】RACE法によるラット型生理活性ポリペプチドのcDNAの取得

ラット型生理活性ポリペプチドcDNAの全コード領域を取得するため、ウシ型を取得した方法に準じて実験を行った。まず実施例18で使用したプライマーP5-1（配列番号：35）、P3-1（配列番号：36）をプライマーとし、鋳型には実施例27でプライマーとしてランダムDNAヘキサマー（BRL社）を加え、モロニーマウス白血病の逆転写酵素（BRL社）により合成した相補DNAを鋳型としてPCRを行った。反応液は鋳型cDNAを1.25μl、dNTP 200μM、プライマーを各1μM、DNA polymeraseとしてExTaq（宝酒造）を用い、添付のバッファー2.5μlを加えて、さらに水で全量を25μlとした。反応は94℃・1分後、98℃・10秒、50℃・30秒、72℃・5秒のサイクルを40回繰り返した後、72℃で20秒放置した。サーマルサイクラーはGeneAmp2400（パーキンエルマー社）を用いた。増幅産物を4%アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約80bpのバンドを切り出し、実施例19に示した方法でDNAを回収、プラスミドベクターpCRTMIIへサブクローニング、大腸菌JM109へ導入し挿入されたcDNA断片の配列を解析した。その結果ラット型生理活性ポリペプチドの部分配列を得ることができた。この配列を基に3' RACE用にRA（配列番号：75）、5' RACE用にRC（配列番号：76）の2本のプライマーを合成し、5' および3' RACEを行った。

RA：5' - CARCAYTCCATGGAGACAA
GAACCCC - 3'（ここでRはAまたはG、YはT

またはCを示す。）（配列番号：75）

RC：5' - TACCAGGCAGGATTGATAC
AGGGG - 3'（配列番号：76）

鋳型は実施例27でMarathon cDNA amplification kit（Clontech）により合成したものを添付のトリシン-EDTAバッファーで40倍に希釈したもの2.5μlを使用した。プライマーには3' RACEにはRAとキット付属のアダプタープライマーAP1を、また5' RACEにはRCとAP1をそれぞれ用いたほかは上記と同様に反応液を調製した。反応条件は94℃・1分後、98℃・10秒、72℃・45秒のサイクルを5回、98℃・10秒、70℃・45秒のサイクルを3回、98℃・10秒、68℃・45秒のサイクルを40回繰り返した。その結果3' RACEからは約400bp、5' RACEからは約400bpと250bpのバンドが得られた。これらを上記と同様の方法で回収し、これらを鋳型として反応に用いたプライマーでDye Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI）により反応し配列を解析した。その結果5' ノンコーディング領域と推定される部分からpolyAまでの配列を得ることができた。

【0108】

【実施例29】PCRによるラット型生理活性ポリペプチドの全長cDNAの取得

実施例28で得られた配列を基に開始コドンを含む領域にrF（配列番号：77）、また終止コドンより3'側にrR（配列番号：78）の2本のプライマーを合成し全長cDNAを含む断片を増幅することとした。

rF：5' - GGCATCATCCAGGAAGACG
GAGCAT - 3'（配列番号：77）

rR：5' - AGCAGAGGAGAGGGAGGGT
AGAGGA - 3'（配列番号：78）

実施例27でモロニーマウス白血病の逆転写酵素を用いて調製したcDNAを鋳型とし、ExTaq（宝酒造）を用いて、95℃・30秒、68℃・60秒のサイクルを40回繰り返してPCRを行った。増幅産物をアガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色し約350bpのバンドを切り出し、実施例19に示した方法でDNAを回収、プラスミドベクターpCRTMIIへサブクローニング、大腸菌JM109へ導入した。生じた形質転換体からプラスミドを抽出し、塩基配列を決定した結果、ラット型生理活性ポリペプチドの全長cDNAを保有するE. coli JM109/pRAV3を得た〔図32〕。

【0109】

【実施例30】ヒト Brain poly(A)⁺RNA画分からのcDNAの合成

ヒト Brain poly(A)⁺RNA画分（Clontech）1μgから、Marathon cDNA amplification kit（Clontech）により、マニュアルに従ってcDNAを合成し、10μlに溶解した。また同poly(A)⁺RNA画分5μg

にプライマーとしてランダムDNAヘキサマー（BRL社）を加え、モロニーマウス白血病の逆転写酵素（BRL社）により、添付バッファーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はエタノール沈殿を行った後、 $30\mu\text{l}$ のTEに溶解した。

【0110】

【実施例31】RACE法によるヒト型生理活性ポリペプチドのcDNAの取得

実施例28で明らかになったラット型生理活性ポリペプチドのアミノ酸配列から〔図33〕に示したように特にラット型とウシ型で保存性の高かった領域を選び以下のR1（配列番号：79）、R3（配列番号：80）、R4（配列番号：81）の3本のプライマーを合成し、ヒトのcDNAを鋳型としてPCRをすることによりこれらに挟まれた領域の増幅を試みた。ここで、図33においてbovine.aaはウシ型ポリペプチドのアミノ酸配列、bovine.seqはウシ型ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列、rat.seqはラット型ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。

R1：5'-ACGTGGCTTCTGTGCTTGTGC-3'（配列番号：79）

R3：5'-GCCTGATCCCGCGGCCCGTGTACCA-3'（配列番号：80）

R4：5'-TTGCCCTTCTCCTGCCGAA GCGGCC-3'（配列番号：81）

実施例30でMarathon cDNA amplification kit（Clontech）により調製したcDNAをトリシン-EDTAバッファーで30倍に希釈したもの $2.5\mu\text{l}$ を鋳型として使用した。反応液はdNTP $200\mu\text{M}$ 、プライマーをR1とR4を各 $0.2\mu\text{M}$ 、Taq Start Antibody（Clontech）と等量混合したDNA polymerase ExTaq（宝酒造）を用い、添付のバッファー $2.5\mu\text{l}$ を加えて、さらに水で全量を $25\mu\text{l}$ とした。反応は $94^{\circ}\text{C}\cdot 1$ 分後、 $98^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 秒、 $68^{\circ}\text{C}\cdot 40$ 秒のサイクルを42回繰り返した後、 72°C で1分間放置した。さらにこの反応液をトリシン-EDTAバッファーで100倍に希釈したもの $1\mu\text{l}$ を鋳型として、プライマーの組み合わせをR1とR3に変えた以外は上記と同様の反応液を調製して $94^{\circ}\text{C}\cdot 1$ 分後、 $98^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 秒、 $68^{\circ}\text{C}\cdot 40$ 秒のサイクルを25回繰り返した。増幅産物を4%アガロース電気泳動、エチジウムブロマイド染色したところ、期待される約130bpのバンドが得られたため、これを実施例28と同様の方法で回収し、その回収した断片を鋳型として、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit（ABI）を用いて反応し配列を解析した結果、ヒト型生理活性ポリペプチドの部分配列を得ることができた。そこでこの配列を基に3'RACE用にプライマーHA（配列番号：82）、HB（配列番号：83）を、5'RACE用にプライマーHE（配列番号：84）、HF（配列番号：85）を合成し、5'および

3'RACEを行った。

HA：5'-GGCGGGGGCTGCAAGTCGTACCCATCG-3'（配列番号：82）

HB：5'-CGGCACTCCATGGAGATCCGCACCCCT-3'（配列番号：83）

HE：5'-CAGGCAGGATTGATGTCAGGGGTGCGG-3'（配列番号：84）

HF：5'-CATGGAGTGCCGATGGGTCGACTTGC-3'（配列番号：85）

- 10 鋳型は実施例30で調製したものをトリシン-EDTAバッファーで20倍に希釈したもの $2.5\mu\text{l}$ を使用した。1回目のPCRは3'RACEにはHAとアダプタープライマーAP1を、5'RACEにはHEとAP1を用いこれまでと同様に反応液を調製した。反応条件は $94^{\circ}\text{C}\cdot 1$ 分後、 $98^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 秒、 $72^{\circ}\text{C}\cdot 35$ 秒のサイクルを5回、 $98^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 秒、 $70^{\circ}\text{C}\cdot 35$ 秒のサイクルを5回、 $98^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 秒、 $68^{\circ}\text{C}\cdot 35$ 秒のサイクルを40回繰り返した。さらにこの反応液をトリシン-EDTAバッファーで100倍に希釈したもの $1\mu\text{l}$ を鋳型として、1回目の反応サイクルと同じサイクルで2回目のPCRを行った。ただし3'RACEはプライマーをHBとAP1に、5'RACEはHFとAP2に変え、またDNA polymeraseとしてKlen Taq（Clontech）を使用し、添付のバッファーで反応液を調製した。その結果、3'RACEでは約250bpのバンドまた5'RACEでは約150bpのバンドが得られ、これらを上記と同様の方法で配列を読み、先に得られた部分配列と併せてヒト型生理活性ポリペプチドの、5'ノンコーディング領域と推定される部分からpolyAまでの配列を得ることができた。

【0111】

【実施例32】PCR法によるヒト型生理活性ポリペプチドの全長cDNAの取得

実施例31で得られた配列を基に5H（配列番号：86）と3HN（配列番号：87）の2本のプライマーを合成し全長cDNAを含む断片を増幅することとした。

5H：5'-GGCCTCCTCGGAGGAGCCAGGGATGA-3'（配列番号：86）

40 3HN：5'-GGGAAAGGAGCCCGAAGGAGAGGAGAG-3'（配列番号：87）

実施例30でモロニーマウス白血病の逆転写酵素（BRL社）を用いて調製したcDNA $2.5\mu\text{l}$ を鋳型とし、Klen Taq DNA polymerase（Clontech）を用いた反応液で、 $94^{\circ}\text{C}\cdot 1$ 分後、 $98^{\circ}\text{C}\cdot 10$ 秒、 $68^{\circ}\text{C}\cdot 30$ 秒のサイクルを40回繰り返した。得られた約360bpの断片を実施例29と同様の方法で、回収、サブクローニング（ただし、ベクターはpCRTM2.1を用いた）、プラスミド回収し、塩基配列を決定した結果、ヒト型生理活性ポリペプチドの全長cDNAを保有するF.coli JM109⁺ pHOV7を得た〔図3

4)。またこのヒト型生理活性ポリペプチドと実施例20に示したウシ型、および実施例29に示したラット型の翻訳領域についてアミノ酸配列を比較した〔図35〕。

【0112】

【実施例33】 (1) UHR-1発現CHO細胞の作製最近、Susan K. Welchらによってラット視交叉上核よりオーファンレセプターであるUHR-1がクローニングされている(Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.209, No.2, pp.606-613, 1995)。本発明者らは、この報告をもとにUHR-1遺伝子によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列とhGR3によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列の比較を行った。その結果、両者は359アミノ酸にわたり91.6%のアイデンティティーを有することから、UHR-1はphGR3のホモログであることが推定された。UHR-1によりコードされる蛋白が19P2-L31のレセプターとして機能することを確認するために以下に述べるように、本発明者らはUHR-1 cDNAをクローニングし、それをCHO細胞に導入して安定的な発現細胞株を作製した。ラットの下垂体前葉からFast TrackTM kit (Invitrogen社)を用いて抽出したpoly(A)RNAを調製した。次に、得られたpoly(A)RNA 0.2μgを鋳型とし、TaKaRa RNA PCR kit (宝酒造)を用いて全量40μlの反応スケールでcDNAを合成した。反応産物は、フェノール：クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈澱を行った後、10μlの蒸留水に溶解した。既知のラット・UHR-1 cDNAの塩基配列(GenBank, Accession Number S77867)をもとに、以下に示す2種の合成DNAプライマーを作成した。

(1) 5'-GTTTCACAG (GTTCGAC) ATG ACCTCAC-3' (括弧内はSalI認識配列を示す) (配列番号: 95)

(2) 5'-CTCAGA (GCTAGC) AGAGT GTCATCAG-3' (括弧内はNheI認識配列を示す) (配列番号: 96)

上記のプライマー(1)と(2)を一組として用いて、上述の方法で合成したcDNAを鋳型としてPCRを行った。反応には、調製したcDNA溶液を5倍に希釈したものを5μl、Ex Taq (宝酒造)とTaq Start Antibody (クロンテック)を1:1で混合したものを1μl、Ex Taqに添付の10×反応バッファーを5μlおよびdNTPを4μl、50μMの濃度に調製したプライマーを各1μl使用し、蒸留水にて液量を50μlに調製した。PCRは、95℃・2分ののち、95℃・30秒、65℃・30秒、72℃・1分の3ステップを1サイクルとして27回繰り返して行い、その後に72℃・7分の伸長反応を加えた。反応終了後に、反応液の一部を用いてアガロースゲル電気泳動を行った。エチジウムブロ

マイド染色し約1.1kbpのバンドを切り出し、遠心濾過チューブ(ミリポア社)で遠心濾過し、フェノール抽出次いでエタノール沈澱を行ってDNAを回収した。回収したDNAをTAクローニングキット(Invitrogen社)のマニュアルに従い、プラスミドベクターpCRII⁺IIへサブクローニングし(以下、pCRII-UHR-1と称する)、大腸菌JM109に導入し、得られた形質転換体をアンピシリンを含むLB培地で培養後、自動プラスミド抽出器(クラボウ社)でプラスミドを得た。このプラスミドをABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing kit, FS (パーキンエルマー社)を用い、マニュアルに従い反応させ、塩基配列を蛍光自動DNAシーケンサー(ABI社)により解読した。塩基配列の解析の結果、PCRによって入手したcDNA断片は1116bpから成ることが確認された〔図52〕。〔図52〕は、発現ベクターpAKKO-UHR-1上で構築されたラット・UHR-1の完全なコード領域の塩基配列と、それにコードされるアミノ酸配列を示す。図中、アンダーラインを付したprimer(1),(2)は、それぞれのプライマー配列の一部に相当する部分を示す。また、二重線は公知の塩基配列と異なる部分を示す(664番目のC、865番目のG、897番目のG)。ここで、公知の塩基配列はデータベースGenBank Accession No. S77867を引用したものである。これらの塩基置換のうち、一つは²⁰L²⁰Leu (CTC)→²⁰V²⁰Val (GTC)のアミノ酸置換を伴うものであった。UHR-1発現ベクターの構築は以下の様にして行った。pCRII-UHR-1を制限酵素NheI(宝酒造)およびSalI(宝酒造)で切断した。切断したサンプルをアガロースゲル電気泳動した後エチジウムブロマイド染色し、そのバンド部分をカミソリで切り出した。このゲル断片をフィルター付き遠心チューブ(ミリポア)に入れ、冷凍庫内で凍結、その後に室温にて融解させた後、チューブを8000回転で1分間遠心して、フィルターの下部にDNA断片を含む溶液を溶出させた。この溶液を、定法に従ってフェノール抽出、フェノール：クロロホルム(1:1)抽出、ジエチルエーテル抽出して不純物を除去した後、エタノール沈澱によってDNAを沈澱させcDNA断片を得た。pAKKO-111Hを制限酵素NheI(宝酒造)およびSalI(宝酒造)で切断した後、上述と同様の方法によりベクター部分をアガロースゲルから分離、抽出した。こうして得られたcDNA断片とpAKKO-111Hの制限酵素消化物をライゲーション・システム(宝酒造)を用い、16℃で30分反応させた。ライゲーション反応産物の一部を用いて、大腸菌JM109を形質転換させ、形質転換体Escherichia coli JM109/pAKKO-UHR-1を得た。得られた形質転換体Escherichia coli JM109/pAKKO-UHR-1をアンピシリン(50μg/ml)を含むLB培地2ml中で一晚培養し、プラスミド自動抽出

装置(クラボウ社)によってプラスミドDNA(pAKKO-UHR-1)を調製した。蛍光式シーケンサーを用いて、cDNA断片とpAKKO-111Hの連結部位の塩基配列を解析し、発現ベクターpAKKO-UHR-1の構築が完了したことを確認した。

(2) CHOdhfr細胞へのUHR-1発現ベクターの導入

直径10cmの組織培養用シャーレに 1×10^6 個のCHOdhfr細胞を播種し、24時間培養した。(1)で得られたUHR-1発現ベクターpAKKO-UHR-1を20 μ g用い、リボソーム法による遺伝子導入キット(シーントランスファール、ニッポンシーン社)を用いて、DNA・リボソームの複合体を形成させた。培地を新鮮なものに交換し、これにDNA・リボソームの複合体を添加して一晩インキュベートした。培地を新鮮なものに交換してさらに1日間培養した後、形質転換体選択用の培地に交換して2日間培養した。さらに、トリプシン-EDTA処理によってシャーレ内の細胞を回収し、細胞密度が希薄な状態にて再培養を行うことによって、形質転換体の割合の増加を図った。これにより、UHR-1を安定に高発現する細胞株CHO-UHR-1のクローンを得た。

【0113】

【実施例34】19P2-L31の 125 Iによる標識および標識体を用いたレセプター結合実験

19P2-L31のヨードラベル化は 125 I-Bolton-Hunter Reagent (NEN/DuPont; NEX-120)を用いて行った。まず、 125 I-Bolton-Hunter Reagent (2200Ci/mmol) 200 μ lを500 μ lエッペンドルフチューブに移し、窒素ガスにて完全に乾燥させた。アセトニトリル2 μ lにて再溶解し、さらに50mMリン酸バッファーpH8.0 4 μ l、合成19P2-L31 3 $\times 10^{-4}$ M 4 μ lを加え、混和し、室温にて40分間反応させた。反応後、1.0Mグリシン5 μ lを加えて反応を停止し、反応液全量を逆相カラム(TOSO; TSKgel ODS-80TMCTP)にかけ、 125 I標識19P2-L31(125 I-19P2-L31)を分離した。 125 I-19P2-L31を含む画分は、2倍量の50mM Tris-HCl pH7.5、0.1%BSA、0.05%CHAPSにて希釈し、少量ずつ分注の後、-20℃にて保存した。レセプター結合実験ではレセプター発現CHO細胞としてCHO-19P2-9、CHO-UHR-1およびmock CHOを用いた。CHO-19P2-9細胞はCHO-19P2細胞を96穴マイクロプレートを用いた限界希釈法により、19P2-L31によるアラキドン酸代謝物の遊離促進反応がより強いクローンとして選択したものである。mock CHO細胞は、発現ベクターpAKKO単独でトランスフォームしたコントロール細胞である。組織培養用フラスコで培養したこれらの細胞を5mM EDTA/PBSにて剥離

し、0.05%BSA、0.05%CHAPSを含むHBSSに 0.5×10^6 cells/mlとなるよう再懸濁した。この細胞浮遊液100 μ lに、 125 I-19P2-L31を200pMとなるように、さらに一部の細胞浮遊液にはNSB(non specific binding; 非特異的結合)として19P2-L31を200nMとなるように追加し、室温にて2.5時間反応させた。反応後、ガラスフィルターGF/F(Wattman)を用いて、B/F分離を行い、フィルターにトラップされたカウントをレセプター結合量として γ -カウンターにて測定した。[図36]には、生細胞における 125 I-19P2-L31を用いたレセプター結合実験の結果を示す。細胞浮遊液 0.5×10^6 cells/ml 100 μ lに 125 I-19P2-L31を200pMとなるように加え、室温2.5時間の反応でレセプターに結合した 125 I-19P2-L31の量および非特異的結合量を γ -カウンターで測定した。実験はtriplicateで行い、その平均値および標準偏差を示した。hGR3とUHR-1を発現させたCHO細胞において、 125 I-19P2-L31の特異的結合が観察された。これらの結果はhGR3およびUHR-1によってコードされる蛋白質が19P2-L31の特異的なレセプターとして機能していることを示している。

【0114】

【実施例35】19P2-L31によるCHO-19P2-9およびCHO-UHR1からの特異的なアラキドン酸代謝物の遊離促進

実施例1と同様の方法でCHO-19P2-9、CHO-UHR1およびmock CHOにおける19P2-L31によるアラキドン酸代謝物遊離活性を測定した。[図37]にはCHO-19P2-9およびCHO-UHR1における19P2-L31によるアラキドン酸代謝物遊離活性の測定結果を示す。実験はduplicateで行い、その平均値を示した。UHR1を発現させたCHO細胞でも、CHO-19P2-9と同様の19P2-L31によるアラキドン酸代謝物遊離の活性が確認された。これらの結果はUHR-1によってコードされる蛋白質がhGR3と同様に19P2-L31の特異的なレセプターとして機能していることを示している。

【0115】

【実施例36】RT-PCRによるラット組織のリカンドポリペプチドおよびラット型G蛋白質共役型レセプター(UHR-1)の発現定量

(1) ラットの組織からの poly(A)⁺RNA調製
8週齢のラット(σ^3)より各種組織の poly(A)⁺RNAを、Isogen (Nippon gene) による total RNA調製に引き続き、オリゴdTセルロースカラム(Pharmacia)を用いて約5~30 μ g調製した。poly(A)⁺RNA画分中の genome DNAを完全に除くため、DNase I (Gibco BRL amplification grade) を1ユニット

用いて室温でDNAを分解した。25mM EDTAを加え、65℃で10分処理し、DNase Iを不活性化した。水で40ng/ μ lに希釈し、その160ngから10ユニットAMV reverse transcriptase XL (Takara), 2.5 μ M random 9mer (Takara, 終濃度2.5 μ M), 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.4mMの各dNTPを用いてcDNAを合成した。合成反応は30℃・10分、42℃・30分、99℃・5分、5℃・5分とした。反応産物をエタノール沈殿しトリシン-EDTAバッファーで40 μ lに溶解した(4ng poly(A)⁺RNA/ μ l)。

(2) ポジティブコントロール用プラスミドベクターの調製

ラットのグリセロールアルデヒド-3-リン酸-脱水素酵素(G3PDH, GenBank accession number M17701)は、FastTrack (Invitrogen)で調製したラット下垂体由来細胞株GH3のpoly(A)⁺RNAから、上記(1)と同様の方法で合成したcDNAを鋳型として、Clontech社のG3PDH増幅用プライマーセットを用いてPCR法で増幅させた。UHR-1はやはりGH3のcDNAを鋳型として、

rRECF: 5'-CCTGCTGGCCATTCTCCTGTCTTAC-3' (配列番号: 88)

と、

rRECR: 5'-GGGTCCAGGTCCCGCA GAAGGTTGA-3' (配列番号: 89)

を用いて増幅し、TACクローニングキット(Invitrogen)のpCR[™]2.1ベクターへサフクローニングして得た。これらを大腸菌JM109に導入して形質転換体を得た。またリガンドペプチドはJM109, pRAV3

として寄託したものをを用いた。これらの形質転換体はアンピシリンを含むLB培地で培養後、Qiagen Plasmid Midi kit (QIAGEN)でプラスミドを精製し、吸光度により濃度を定量してポジティブコントロール用プラスミドベクターとした。

(3) RT-PCR

上記(1)および(2)で調製したcDNA溶液およびポジティブコントロール用プラスミドベクターをそのままあるいは適当な濃度に水で希釈して鋳型とした。G3PDH, UHR-1およびリガンドペプチド増幅用プライマーは、それぞれClontech社のG3PDH増幅用プライマーセット、rRECFとrRECR、

r19F: 5'-GAAGACGGAGCATGGCCCTGAAGAC-3' (配列番号: 90)

と、

r19R: 5'-GGCAGCTGAGTTGGCCAAGTCCAGT-3' (配列番号: 91)

を終濃度200nMで使用した。反応液は希釈した鋳型4 μ l、各200nMプライマー、dNTP (終濃度各100 μ M)、DNA polymeraseとしてKlenTaq

(Clontech)を用い、KlenTaq添付のバッファーと水で25 μ lとした。反応はG3PDHは94℃・1分、98℃・10秒、65℃・20秒、72℃・40秒のサイクルを26回、UHR-1とリガンドペプチドは94℃・1分、98℃・10秒、68℃・25秒のサイクルを34回繰り返した。増幅産物をあらかじめエチジウムブロマイド染色した1.2%あるいは4%のアカロースゲルを用いて電気泳動し、得られた泳動図をCCDカメラ(FOTODYNE, Foto/Eclipse)で取り込み、解析ソフト(Advanced American Biotechnology)でバンドの濃さを数値化、定量した。定量値はG3PDHは4ng poly(A)⁺RNAあたりのpgで、またUHR-1とリガンドペプチドは4ng poly(A)⁺RNAあたりのpgおよびその値をG3PDHのpgで割った値として算出した

【図38、39】。その結果、UHR-1とリガンドペプチドは調べた組織全てで発現が確認された。UHR-1は下垂体で発現量が多く、脳全体にも広く分布していたが、末梢の組織では副腎を除いて発現はあまり高くなかった。一方、リガンドペプチドは、脳では延髄、視床下部で発現が高く、下垂体での発現は低かった。末梢組織においても肺、胸腺、脾臓、腎臓、副腎、精巣などで比較的高い発現が認められた。これらの結果はUHR-1とそのリガンドペプチドが様々な組織においてその機能調節に重要な役割を果たしていることを示している。

【0116】

【実施例37】19P2-L31のグルコースによる血漿インスリン濃度の増加に及ぼす影響

ペントバルビタール(65mg/kg、腹腔内投与)で麻酔したWistarラット(8-10週齢、♂)に総頸静脈から一過性にグルコース(86mg/ラット)を単独で、あるいは同グルコースと19P2-L31(ラットあたり各675 μ mol、2.25nmol、6.75nmol、67.5nmol)を同時投与し、投与した反対側の総頸静脈から経時的に採血し血漿中のインスリン濃度をラジオイムノアッセイで測定した。測定にはアマシャム社のインスリンアッセイキットを使用した。19P2-L31は投与量675 μ mol、2.25nmol、6.75nmolでは、グルコースによる投与2分後の急激な第一相目のインスリン濃度の増加、および投与後6分以降に見られる緩徐な第二相目の血漿インスリン濃度の増加を部分的に抑制した。67.5nmolの19P2-L31は第一相と第二相両方のインスリン濃度の増加を完全に抑制した【図40】。

【0117】

【実施例38】マウスの行動量に及ぼすリガンドペプチドの影響

本発明者らは、19P2-L31、19P2-L20のマウス側脳室内投与が行動量に及ぼす影響を検討した。成熟ICR系雄性マウス(手術時体重:約35g)をペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、脳定位固定装置に固定した。頭蓋骨を露出し、一側脳室

にガイドカニューレを埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。側脳室内薬液注入用のステンレス製ガイドカニューレ(2.4 G、長さ5mm)の先端をA P: +0.6mm (ブレグマより)、L: 左1mm、H: -1mm (硬膜より)の位置に挿入した。ガイドカニューレは頭蓋骨に接着剤で固定した。術後、マウスは3日以上飼育して術後の回復を待ってから行動解析実験を行った。マウスの自発運動量の測定には、防音箱内の24×37×30cmの透明アクリル製の自発運動測定用ケージを用いた。マウスを該ケージに一匹ずつ入れ、12時間毎の明暗条件(明: 6-18時)で、また、水と餌は自由に摂取できる条件下で自発運動量と立ち上がり行動量をそれぞれ測定した。行動量の測定には、Supermex(室町機械)を用いた。薬物あるいはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)は午後2:30±30分に投与した。投与時には、ステンレス製マイクロインジェクションカニューレ(30 G、長さ6mm)をガイドカニューレに挿入した。マイクロインジェクションカニューレは、テフロンチューブを用いてマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSあるいはペプチドを溶解したPBSを流速2μl/分で2分間注入した。注入後は、2分間以上待ってからマイクロインジェクションカニューレを外し、行動量を測定した。結果は、平均値±S. E. M. で表し、これらペプチド処置とPBS処置とが体温に及ぼす影響に有意差があるか否かの検定は Student's t-test によって行った。判定は、両側検定で危険率(p)が5%以下を統計的に有意であるとした。〔図41〕に示すごとく、19P2-L31を10nmol投与した場合、マウスの自発運動量は投与後70分後から105分後まで、有意に増加した。立ち上がり行動も同様に有意な変化を示した。19P2-L31を1nmol投与した場合、自発運動量には変化が認められず、立ち上がり行動量が投与105分後で有意な低下を示したのみであった〔図42〕。19P2-L31を0.1nmol投与した場合、自発運動量は、投与後25分および40分、70分において有意な増加を示した。立ち上がり行動量にも同様の増加傾向は認められたが有意ではなかった〔図43〕。また、19P2-L31を0.01nmol投与した場合、自発運動量は、投与後20分および40分で有意に増加した。立ち上がり行動も同じように増加傾向を示したが有意な変化は認められなかった〔図44〕。

【0118】

【実施例39】マウスのレセルピン誘発低体温に及ぼすリガンドポリペプチドの影響

成熟ICR系雄性マウス(手術時体重: 約35g)をペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、脳定位固定装置に固定した。頭蓋骨を露出し、一側脳室にガイドカニューレを埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。側脳室内薬液注入用のステンレス製ガイドカニューレ(2.4 G、長さ5mm)の先端をA

P: +0.6mm (ブレグマより)、L: 左1mm、H: -1mm (硬膜より)の位置に挿入した。ガイドカニューレは頭蓋骨に接着剤で固定した。術後、マウスは3日以上飼育して術後の回復を待ってから体温測定を行った。レセルピン(アポブロン注1mg、第一製薬)3mg/kgを皮下注射し、その15時間後にマウスを個別の測定用ケージに移した。ステンレス製マイクロインジェクションカニューレ(30 G、長さ6mm)をガイドカニューレに挿入した。マイクロインジェクションカニューレは、テフロンチューブを用いてマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSあるいはペプチドを溶解したPBSを流速2μl/分で2分間注入した。注入後は、2分間以上待ってからマイクロインジェクションカニューレを外し、直腸温を測定した。結果は、平均値±S. E. M. で表し、これらペプチド処置とPBS処置とが体温に及ぼす影響に有意差があるか否かの検定は Student's t-test によって行った。判定は、両側検定で危険率(p)が5%以下を統計的に有意であるとした。〔図45〕に示すように、19P2-L31を10nmol投与した場合、レセルピンによって低下していた体温はPBSを投与した対照群に比し有意に上昇した。この体温の上昇は、19P2-L31投与後45分でピークに達した。一方、1nmolの19P2-L20投与群と対照群との間には差が認められなかった。

【0119】

【実施例40】リガンドポリペプチドがラットの血圧に及ぼす影響

本発明者らは、19P2-L31の延髄最後野への注入が血圧に及ぼす影響を検討した。成熟Wistar系雄性ラット(手術時体重: 約300g)をペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、ラット脳定位固定装置に固定した。切開用バーはインターオーラルラインから3.3mm低くした。頭蓋骨を露出し、ガイドカニューレを埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。また、その周囲の2ヶ所にアンカービスを埋めた。ステンレス製ガイドカニューレ、AG-12(内径0.4mm、外径0.5mm、エイコム社)を、その先端が最後野の上部に位置するように挿入した。そのために、ガイドカニューレは垂直方向から20度の角度をつけて前方より挿入した(〔図46〕、但し図中にはガイドカニューレより1.0mm長いマイクロインジェクションカニューレを示す)。定位座標は、PaxinosとWatson(1986)のアトラスを参考にしてA P: -0.6mm (インターオーラルラインより)、L: 0.0mm、H: +1.5mm (インターオーラルラインより)とした。ガイドカニューレは瞬間接着剤と歯科用セメントおよびアンカービスで頭蓋骨に固定した。ガイドカニューレにはステンレス製ダミーカニューレ、AD-12(外径0.35mm、エイコム社)を挿入し、キャップナット(エイコム社)で固定した。その後、ラットは個別のケージで飼育した。ガイ

ドカニューレを埋め込んでから約1週間飼育して術後の回復を待ち、無麻酔血圧測定用の手術を行った。ラットをベントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、解剖用パッドの上に背位に固定して左側の大腿動脈を露出させた。ポリエチレンチューブSP35（内径0.5mm、外径0.9mm、夏目製作所）を約60cmの長さに切り、200単位/mlヘパリン含有生理食塩水で満たした後、大腿動脈に約2.5cm挿入し固定した。チューブのもう一端は背側の皮下を通して頸部（背側）より露出させた。術後一晩待ってからポリエチレンチューブをトランスデューサー（Spectramed）に接続し、血圧を測定した。安定した血圧が測定可能になった後、ラットの頭蓋骨に装着したキャップナットとダミーカニューレを取り外し、代わりにテフロンチューブ（長さ50cm、内径0.1mm、外径0.4mm、エイコム社）につなげたステンレス製マイクロインジェクションカニューレ、AMI13（内径0.17mm、外径0.35mm、エイコム社）を挿入した。マイクロインジェクションカニューレの長さは、その先端1mmがガイドカニューレから露出するように調節しておいた（図46）。テフロンチューブの一方をマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSまたは19P2-L31を溶解させたPBSを1.0 μ l/分の流速で計2 μ lを最後野に注入した。血圧測定後、19P-L31を注入したマイクロインジェクションカニューレを外し、色素（エバンスブルー）注入用マイクロインジェクションカニューレに替えた。色素は、19P-L31と同様に流速1.0 μ l/分で2分間注入した後約3分間待ってからマイクロインジェクションカニューレを外した。ラットを断頭し、速やかに脳を摘出し、凍結した。クリオスタットを用いて凍結切片を作製し、色素の注入位置を確認した。上記実験の結果、延髄最後野に19P2-L31を10nmol注入すると血圧の上昇が認められた。脈波および平均血圧の典型例を（図47）に示す。

【0120】

【実施例41】リガンドポリペプチドが血漿中下垂体ホルモン量に及ぼす影響

本発明者らは、19P2-L31の第三脳室内投与が血漿中の下垂体ホルモン量に及ぼす影響を検討した。成熟Wistar系雄性ラット（手術時体重：約290～350g）をベントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、ラット脳定位固定装置に固定した。切歯用バーはインターオーラルラインから3.3mm低くした。頭蓋骨を露出し、ガイドカニューレを埋め込むために歯科用ドリルを用いて骨に穴を開けた。また、その周囲の1ヶ所にアンカービスを埋めた。ステンレス製ガイドカニューレ、AG-12（内径0.4mm、外径0.5mm、エイコム社）を、その先端が第三脳室の上部に位置するように挿入した。定位座標は、PaxinosとWatson（1986）のアトラスに従い、AP：+7.2mm（インターオーラルラインより）、L：0.0mm、H：+2.0mm（インターオ-

ーラルラインより）とした。ガイドカニューレは瞬間接着剤と歯科用セメントおよびアンカービスで頭蓋骨に固定した。ガイドカニューレにはステンレス製ダミーカニューレ、AD-12（外径0.35mm、エイコム社）を挿入し、キャップナット（エイコム社）で固定した。術後、ラットを個別のケージで3日以上飼育し、術後の回復を待ってから、実験を行った。上記手術を施したラットをベントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、解剖用パッドの上に背位に固定した。両側の頸静脈を露出させた後、容量1mlのツベルクリン用注射筒と24G注射針（いずれもテルモ社）を用いて400 μ lの血液を採取した。血液凝固を防止するため、注射筒には予め200単位/mlのヘパリンを含有する生理食塩水を20 μ l入れておいた。ラットの頭蓋骨に装着したキャップナットとダミーカニューレを取り外し、代わりにテフロンチューブ（長さ50cm、内径0.1mm、外径0.4mm、エイコム社）につなげたステンレス製マイクロインジェクションカニューレ、AMI13（内径0.17mm、外径0.35mm、エイコム社）を挿入した。マイクロインジェクションカニューレの長さは、その先端1mmがガイドカニューレから露出するように調節しておいた。テフロンチューブの一方をマイクロシリンジポンプにつなぎ、PBSまたは19P2-L31を溶解させたPBSを2.5 μ l/分の流速で計10 μ lを第三脳室に注入した。注入終了後1分間待ってからマイクロインジェクションカニューレを取り外し、再びダミーカニューレをキャップナットで固定した。脳室内投与を開始する直前、および脳室内投与の開始時点から10、20、30、40、60分後に頸静脈より400 μ lずつ採血した。採取した血液は微量高速冷却遠心機（MR-150、トミー精工）を用いて遠心（5,000rpm、10分間）し、上清（血漿）を回収した。血漿中に含まれる下垂体ホルモン（プロラクチン、黄体形成ホルモン（LH）、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、成長ホルモン（GH））量をそれぞれラジオイムノアッセイを用いて測定した。結果は、平均値 \pm S.E.M.で表した。19P2-L31を溶解させたPBS投与群とPBSのみを投与した対照群との間に有意差があるか否かの検定にはStudent's t-testを用いた。判定は、両側検定で危険率5%以下を統計的に有意であるとした。（図48）に示すごとく、血漿中成長ホルモン量は、50nmolの19P2-L31を第三脳室に投与後20分において対照群に比し有意に減少した。投与後10、30、40分においても減少傾向は認められたが、有意ではなかった。また、投与60分後では対照群との間に差は認められなかった。また、血漿中プロラクチン、LH、ACTH、TSH量は有意な変化を示さなかった。

【0121】

【実施例42】リガンドポリペプチドが自由行動ドラ-

トにおける血漿中成長ホルモン量に及ぼす影響
成熟Wistar系雄性ラットをペントバルビタール50mg/kgの腹腔内投与にて麻酔し、実施例4.1と同様にステンレス製ガイドカニューレ、AG-12（内径0.4mm、外径0.5mm、エイコム社）を、その先端が第三脳室の上部に位置するように固定した。術後、ラットを個別のケージで3日以上飼育し、術後の回復を待ってからペントバルビタール麻酔下（50mg/kg、i.p.）でヘパリン（200単位/ml）含有生理食塩水を満たしたカニューレ（長さ30cm、内径0.5mm、外径0.9mm、夏目製作所）を右頸静脈より右心房に挿入した。ラットを一晩飼育して完全に麻酔から覚醒させた後、透明アクリル製ケージ（30×30×35cm）に移した。容量1mlのツベルクリン用注射筒と24G注射針（いずれもテルモ社）を心房に挿入したカニューレに接続し、300 μ lの血液を採取した。血液凝固を防止するため、注射筒には予め200単位/mlのヘパリンを含有する生理食塩水を200 μ l入れておいた。第三脳室に挿入したガイドカニューレにテフロンチューブ（長さ50cm、内径0.1mm、外径0.4mm、エイコム社）につなげたステンレス製マイクロインジェクションカニューレ、AMI13（内径0.17mm、外径0.35mm、エイコム社）を挿入した。マイクロインジェクションカニューレの長さは、その先端1mmがガイドカニューレから露出するように調節しておいた。テフロンチューブの一方をマイクロシリシポンプにつなぎ、PBSまたは19P2-L31を溶解させたPBSを2.5 μ l/分の流速で計10 μ lを第三脳室に注入した。第三脳室内投与を開始10分後に心房に挿入したカニューレを通して生理食塩水に溶解させた成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）を5 μ g/kg投与した。脳室内投与を開始する直前、およびGHRH投与時点から10、20、30、40、60分後に頸静脈より300 μ lずつ採血した。採取した血液は遠心（5,000rpm、10分間）し、上清（血漿）を回収した。血漿中に含まれる成長ホルモン（GH）量はラジオイムノアッセイを用いて測定した。結果は、平均値 \pm S.E.M.で表した。19P2-L31を溶解させたPBS投与群とPBSのみを投与した対照群との間に有意差があるかどうかの検定にはStudent's t-testを用いた。判定は、両側検定で危険率5%以下を統計的に有意であるとした。

〔図4.9〕に示すごとく、5 μ g/kgのGHRH投与は血漿中GH量を増加させた。しかし、50nmolの19P2-L31を第三脳室に投与するとGHRHによる血漿中GH量の増加は有意に抑制された。

【0122】

【実施例4.3】ウサギポリクローナル抗体の作製

ウシ19P2-L31のN末端側ペプチド〔ペプチド-I、SRAHQISMETPTDC（配列番号：92）〕、C末端側ペプチド〔ペプチド-II、CAWYAGRGIRPVGRFNH₂（配列番号：93）〕および中央部分のペプチド〔ペプチド-II

I、CEIRTPDINPAWYAG（配列番号：94）を化学合成し、常法通りKLHと結合した。フロインドの完全アジュバント（FCA）と生理食塩水に溶解した上記ペプチド600 μ gを混合し、均一なエマルジョンにした後、それぞれ3羽ずつのウサギ（NZW、♂、2.5kg）の背部に皮下注射した。さらに3週間後追加免疫として、フロインドの不完全アジュバント（FIA）と生理食塩水に溶解した上記のペプチドとKLHのコンジュゲイトを混合し、均一なエマルジョンにした後ウサギ背部に皮下注射した。3週間間隔で計3回追加免疫を行った。抗体価の測定は以下のように行った。最終免疫の2週間後、ウサギ耳の静脈から採血し、血液を37℃で1時間保温後、4℃で1昼夜放置したのち遠心し、抗血清を得た。抗血清を各濃度に希釈し、予め、ヤギ抗ウサギIgG(Fc)抗体を固定したポリスチレン性96穴マイクロプレートに100 μ lずつ加え、4℃で16時間インキュベートした。抗血清を除去し、洗浄後、HRP標識ペプチド-I、II、IIIを添加した。室温で4時間インキュベートし、十分にウエルを洗浄した後、反応基質を加え、呈色反応を行った。酵素反応停止溶液100 μ lを加えて反応を停止させた後、マイクロプレート用比色計を用い450nmにおける吸光度を測定した。〔図5.0〕に示すように免疫後の血清中に各ペプチドに対する結合活性が検出された。抗体は以下のようにして調製した。抗血清は硫酸塩析によりIgG画分を濃縮し、ホウ酸バッファーに溶解後、透析した。抗ペプチド-IのIgG画分をペプチド-Iセルロフアインカラムに、さらに抗ペプチド-IIおよび抗ペプチド-IIIのIgG画分を19P2-L31-セファローズ4Bカラムに負荷し、ホウ酸バッファーおよび酢酸バッファー（100mM、pH4.5）で洗浄後、グリシン塩酸バッファー（200mM、pH2.0）でそれぞれ溶出した。溶出液には1Mのトリスを加えて中和した後、精製抗体として使用した。

【0123】

【実施例4.4】ウサギポリクローナル抗19P2-L31抗体による19P2-L31の生物活性の中和作用
実施例4.3の方法で調製した3種類のIgG抗体の19P2-L31に対する中和活性を実施例1.1記載のアラキドン酸代謝物放出活性測定系により検討した。すなわち、IgG抗体を各濃度に希釈し、19P2-L31（5 \times 10⁻¹⁰M）と室温で1時間インキュベーション後、残存活性を19P2レセプター発現CHO細胞を使用して測定した〔図5.1〕。ペプチド-IIに対するポリクローナル抗体に最も強い19P2-L31に対する中和活性が認められた。

【0124】

【製剤例1】日局注射用蒸留水50mlに実施例2.1で得られた化合物50mgを溶解した後、日局注射用蒸留水を加えて100mlとする。この溶液を滅菌条件下で濃縮し、次にこの溶液1mlずつを取り滅菌条件下注射

用バイアルに充填し凍結乾燥し密閉する。

【製剤例2】日局注射用蒸留水50mlに実施例21で得られた化合物100mgを溶解した後、日局注射用蒸留水を加えて100mlとする。この溶液を滅菌条件下で濾過し、次にこの溶液1mlずつを取り滅菌条件下注射用バイアルに充填し凍結乾燥し密閉する。

【0125】

【発明の効果】本発明の生理活性物質であるリガンドポリペプチドまたはそのアミド、エステルもしくはその塩、該部分ペプチドまたは該リガンドポリペプチドをコードするDNAは、下垂体、中枢神経系あるいは臓器をはじめ様々な組織・臓器（心臓、肺、肝臓、脾臓、胸腺、腎臓、副腎、骨格筋、精巣など）の機能調節作用を有し、医薬として有用である。また、該リガンドポリペプチドは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアゴニストまたはアンタゴニスト化合物のスクリーニングに有用である。該スクリーニングにより得られる化合物もまた上記した組織・臓器の機能調節作用を有し、医薬として有用である。本発明のリガンドポリペプチド、該アゴニストまたはアンタゴニストの作用について以下に詳細に説明する。上記の実施例37～41は、リガンドポリペプチドの局所投与により、自発運動量、立ち上がり行動量の増加、体温の上昇、血圧上昇、血漿中成長ホルモン量の低下などを引き起こすことを証明したものである。これらの生理活性は、リガンドポリペプチドが中枢神経系および下垂体内分泌系に作用した場合に生じる種々の顕著な生理学的変化を最初に証明したものである。このように、本発明のリガンドポリペプチドまたはその塩は、ヒトあるいは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ニワトリ、ウサギ、イヌ、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の中枢神経系に作用し、種々の薬理学的変化を惹起するので、脳内神経系あるいは内分泌系を変化させるものである。19P2-131をマウスに側脳室内投与したところ、0.01～10 μ molで行動量が増加した。この事実は、リガンドポリペプチドが中枢神経系のG蛋白質共役型レセプターを介して運動系の変化を引き起こさせたものである。また、本ペプチドのマウス側脳室内投与では体温上昇が認められ、ラットの延髄最後野に投与した場合には血圧が上昇した。これらの作用は既知の中枢神経系刺激剤（例えば、アンフェタミン、コカイン、メチルフェニデートなど）の薬理作用と類似している。したがって、リガンドポリペプチドは、主として生体アミン（ドーパミン、ノルアドレナリン、セロトニン）を神経終末の貯蔵部位から放出させるものであることがわかる（融道男と吉川武男「生体の科学」42:535-536;1991）。さらに、ラットの第三脳室に19P2-131を注入したところ、血漿中の成長ホルモン量が減少した。このことは、本リガンドポリペプチドが視床下部に作用し、視床下部-下垂体系を介した下垂体ホルモン分泌に関与していることを示すものである。第

三脳室近傍には下垂体からの成長ホルモン分泌を調節する作用を有する成長ホルモン放出ホルモン（GHRH）やソマトスタチンが存在する（遠山正弥ら「化学的神経機能解剖学」:167-216;1987）。したがって、19P2-

131は神経系を介してあるいは直接下垂体に作用して、これらの物質の放出を調節しているものである。上記の事実は、リガンドポリペプチドが中枢神経系に作用して自律神経系を調節しているペプチドであることを示すものである。本リガンドポリペプチドおよびその受容体のmRNAが視床下部や延髄に高発現しているという事実も、リガンドポリペプチドが自律神経系の調節に関与していることを示す。事実、自律神経系通路に対する上位中枢は延髄と視床下部であり、ここで交感神経系と副交感神経系の統合が行われ、神経性調節、体液性調節の両方に重要な役割を果たしていることが知られている。これらの知見に基づけば、リガンドポリペプチド、該アゴニストまたはそれらの塩は、自発運動亢進を生ずる中枢神経系刺激剤として有用であり、例えば老人性痴呆、脳血管性痴呆（脳血管障害に起因する痴呆）、系統変性型の退行変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、感染性疾患（例えば、クロイツフェルト-ヤコブ病などの遅発ウイルス感染症）に起因する痴呆、内分泌性・代謝性・中毒性疾患（例えば、甲状腺機能低下症、ビタミンB12欠乏症、アルコール中毒、各種薬剤・金属・有機化合物による中毒など）に起因する痴呆、腫瘍性疾患（例えば、脳腫瘍など）に起因する痴呆、外傷性疾患（例えば、慢性硬膜下血腫など）に起因する痴呆、鬱病、多動児（微細脳障害）症候群もしくは意識障害の予防・治療剤などとして用いることができる。一方、リガンドポリペプチドのアンタゴニストあるいはその塩は、中枢神経系抑制剤などとして有用であり、例えば抗精神病剤、抗ハンチントン病剤、抗不安剤、催眠鎮静剤などとして用いることができる。延髄最後野にリガンドポリペプチドを注入すると血圧が上昇することが明らかになった。したがって、リガンドポリペプチド、リガンドポリペプチドのアゴニストまたはそれらの塩は、昇圧剤などとして有用である。一方、リガンドポリペプチドのアンタゴニストあるいはその塩は、降圧剤などとして有用である。リガンドポリペプチドが視床下部に作用すると血漿中の成長ホルモン量が低下することが観察された。成長ホルモンの過剰な分泌は巨人症や先端肥大症を引き起こす（片桐ら「内分泌症候群」:78-80;1993、廣井ら「内分泌症候群」:149-151;1993）。したがって、成長ホルモンの分泌を抑制するリガンドポリペプチド、リガンドポリペプチドのアゴニストまたはそれらの塩は、巨人症、先端肥大症などの予防・治療剤などとして用いることができる。また、成長ホルモンは肝臓からのグルコースの放出を促進し、筋肉や脂肪組織による血中からのグルコースの取り込みを抑制する結果、高血糖

や糖尿を引き起こす（小林英司 内分泌現象、1980）。
 実際、糖尿病患者では成長ホルモン分泌量が増加しているといわれている（清野裕 内分泌・代謝病学：385-402；1994）。したがって、リガンドポリペプチド、リガンドポリペプチドのアゴニストまたはそれらの塩は、糖尿病などの予防・治療剤などとして用いることができる。一方、上記実施例で得られた結果から、リガンドポリペプチドのアнтаゴニストは成長ホルモンの分泌を促進する。したがって、リガンドポリペプチドのアнтаゴニストまたはその塩は、成長ホルモンが減少する下垂体機能低下症や下垂体性小人症、低血糖症などの予防・治療剤などとして用いることができる。また、成長ホルモンや成長ホルモンによって分泌されるインスリン様成長 *

配列

```

Met Lys Ala Val Gly Ala Trp Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu
  1             5             10             15
Ala Leu Gln Gly Ala Ala Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile
             20             25             30
Arg Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg
             35             40             45
Pro Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Ala Pro Gly Asp Gly Pro
             50             55             60
Arg Pro Gly Pro Arg Arg Val Pro Ala Cys Phe Arg Leu Glu Gly Gly
             65             70             75             80
Ala Glu Pro Ser Arg Ala Leu Pro Gly Arg Leu Thr Ala Gln Leu Val
             85             90             95
Gln Glu
  
```

【0127】

【配列番号：2】

配列の長さ：294

配列の型：核酸

配列

```

ATGAAGGCGG TGGGGGCGTG GCTCCTCTGC CTGCTGCTGC TGGGCCTGGC CCTGCAGGGG 60
GCTGCCAGCA GAGCCACCA GCACTCCATG GAGATCCGCA CCCCCGACAT CAACCCTGCC 120
TGGTACGCRG GCCGTGGGAT CCGGCCCGTG GGCCGCTTCG GCCGGCGAAG AGCTGCCCCY 180
GGGGACGGAC CCAGGCTGG CCCCCGGCGT GTCCCGCCCT GCTTCCGCCT GGAAGCGGY 240
CTGAGCCCT CCGAGCCCT CCGGGGCGG CTGACGGCC AGCTGGTCCA GGAA 294
  
```

【0128】

【配列番号：3】

配列の長さ：29

配列

```

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn
  1             5             10             15
Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly
             20             25
  
```

【0129】

【配列番号：4】

配列の長さ：19

配列

```

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr50Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro
  
```

* 因子は筋委縮性側索硬化症、骨粗鬆症、腎不全、手術後の栄養状態改善などに効果がある（鎮目ら 内分泌症候群：84-87；1993、日経バイオ年鑑96：453-454；1996、飛梅らホルモンと臨床 44：1205-1214；1996）ので、リガンドポリペプチドのアнтаゴニストまたはその塩はこれら疾患の予防・治療剤として用いることができる。

【0126】

【配列表】

【配列番号：1】

10 配列の長さ：98

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：cDNA

※ 特徴を決定した方法：S

★配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

★40 配列の種類：ペプチド

☆配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：ペプチド

93
1 5 10 15
Val Gly Arg
19

【0130】

【配列番号：5】

配列の長さ：31

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn
1 5 10 15
Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe
20 25 30

【0131】

【配列番号：6】

配列の長さ：32

※ 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn
1 5 10 15
Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly
20 25 30

【0132】

【配列番号：7】

配列の長さ：33

★ 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn
1 5 10 15
Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly
20 25 30

Arg

33

【0133】

【配列番号：8】

配列の長さ：20

☆ 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro
1 5 10 15
Val Gly Arg Phe
20

【0134】

【配列番号：9】

配列の長さ：21

◆ 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

◆40 配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr
Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro
1 5
10 15
Val Gly Arg Phe Gly
20

【0135】

【配列番号：10】

配列の長さ：22

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：ペプチド

95

96

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr
 Ala Gly Arg Gly Ile Arg Pro
 1 5
 10 15
 Val Gly Arg Phe Gly Arg
 20

【0136】

【配列番号：11】

配列の長さ：87

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：cDNA

*

配列

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60
 GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGC 87

【0137】

【配列番号：12】

配列の長さ：57

配列の型：核酸

※ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

※

配列

ACCCCGGACA TCAACCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCGT GGGCCGC 57

【0138】

【配列番号：13】

配列の長さ：93

配列の型：核酸

★ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

★

配列

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60
 GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGCCG TTC 93

【0139】

【配列番号：14】

配列の長さ：96

配列の型：核酸

☆ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：cDNA

☆

配列

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60
 GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGCCG TTCGGC 96

【0140】

【配列番号：15】

配列の長さ：99

配列の型：核酸

◆ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

◆

配列

AGCAGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCG ACATCAACCC TGCCTGGTAC 60
 GCRGGCCGTG GGATCCGGCC CGTGGGCCG TTCGGCCG 99

【0141】

【配列番号：16】

配列の長さ：60

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列

ACCCCGGACA TCAACCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCGT GGGCCGCTC 60

【0142】

【配列番号：17】

配列の長さ：63

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

50 トポロジー：直鎖状

配列の種類: cDNA

配列

ACC'CCCGACA TCAACCCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCGT GGGCCGCTTC 60
GGC 63

【0143】

【配列番号: 18】

配列の長さ: 66

配列の型: 核酸

* 鎖の数: 二本鎖

トポロジ: 直鎖状

配列の種類: cDNA

*

配列

ACCCCGACA TCAACCCTGC CTGGTACGCR GGCCGTGGGA TCCGGCCCGT GGGCCGCTTC 60
GGCCGG 66

【0144】

【配列番号: 19】

配列の長さ: 91

※配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

※ 配列の種類: ペプチド

配列

Leu Val Leu Val Ile Ala Arg Val Arg Arg Leu His Asn Val Thr Asn
1 5 10 15
Phe Leu Ile Gly Asn Leu Ala Leu Ser Asp Val Leu Met Cys Thr Ala
20 25 30
Cys Val Pro Leu Thr Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Pro Arg Gly Trp Val
35 40 45
Phe Gly Gly Gly Leu Cys His Leu Val Phe Phe Leu Gln Pro Val Thr
50 55 60
Val Tyr Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Thr Ile Ala Val Asp Arg Tyr
65 70 75 80
Val Val Leu Val His Pro Leu Arg Arg Arg Ile
85 90

【0145】

【配列番号: 20】

配列の長さ: 59

★配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

★30 配列の種類: ペプチド

配列

Gly Leu Leu Leu Val Thr Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Val Ile Leu Leu
1 5 10 15
Ser Tyr Val Arg Val Ser Val Lys Leu Arg Asn Arg Val Val Pro Gly
20 25 30
Cys Val Thr Gln Ser Gln Ala Asp Trp Asp Arg Ala Arg Arg Arg
35 40 45
Thr Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val Val
50 55

【0146】

【配列番号: 21】

配列の長さ: 370

☆配列の型: アミノ酸

トポロジ: 直鎖状

☆ 配列の種類: ペプチド

配列

Met Ala Ser Ser Thr Thr Arg Gly Pro Arg Val Ser Asp Leu Phe Ser
1 5 10 15
Gly Leu Pro Pro Ala Val Thr Thr Pro Ala Asn Gln Ser Ala Glu Ala
20 25 30
Ser Ala Gly Asn Gly Ser Val Ala Gly Ala Asp Ala Pro Ala Val Thr
35 40 45
Pro Phe Gln Ser Leu Gln Leu Val His Gln Leu Lys Gly Leu Ile Val

50 55 60
 Leu Leu Tyr Ser Val Val Val Val Gly Leu Val Gly Asn Cys Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Leu Val Ile Ala Arg Val Arg Arg Leu His Asn Val Thr Asn
 85 90 95
 Phe Leu Ile Gly Asn Leu Ala Leu Ser Asp Val Leu Met Cys Thr Ala
 100 105 110
 Cys Val Pro Leu Thr Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Pro Arg Gly Trp Val
 115 120 125
 Phe Gly Gly Gly Leu Cys His Leu Val Phe Phe Leu Gln Pro Val Thr
 130 135 140
 Val Tyr Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Thr Ile Ala Val Asp Arg Tyr
 145 150 155 160
 Val Val Leu Val His Pro Leu Arg Arg Arg Ile Ser Leu Arg Leu Ser
 165 170 175
 Ala Tyr Ala Val Leu Ala Ile Trp Ala Leu Ser Ala Val Leu Ala Leu
 180 185 190
 Pro Ala Ala Val His Thr Tyr His Val Glu Leu Lys Pro His Asp Val
 195 200 205
 Arg Leu Cys Glu Glu Phe Trp Gly Ser Gln Glu Arg Gln Arg Gln Leu
 210 215 220
 Tyr Ala Trp Gly Leu Leu Leu Val Thr Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Val
 225 230 235 240
 Ile Leu Leu Ser Tyr Val Arg Val Ser Val Lys Leu Arg Asn Arg Val
 245 250 255
 Val Pro Gly Cys Val Thr Gln Ser Gln Ala Asp Trp Asp Arg Ala Arg
 260 265 270
 Arg Arg Arg Thr Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val Val Phe Ala
 275 280 285
 Val Cys Trp Leu Pro Leu His Val Phe Asn Leu Leu Arg Asp Leu Asp
 290 295 300
 Pro His Ala Ile Asp Pro Tyr Ala Phe Gly Leu Val Gln Leu Leu Cys
 305 310 315 320
 His Trp Leu Ala Met Ser Ser Ala Cys Tyr Asn Pro Phe Ile Tyr Ala
 325 330 335
 Trp Leu His Asp Ser Phe Arg Glu Glu Leu Arg Lys Leu Leu Val Ala
 340 345 350
 Trp Pro Arg Lys Ile Ala Pro His Gly Gln Asn Met Thr Val Ser Val
 355 360 365
 Val Ile
 370

【0147】

【配列番号：22】

配列の長さ：206

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

配列

Leu Val Leu Val Ile Ala Arg Val Arg Arg Leu Tyr Asn Val Thr Asn
 1 5 10 15
 Phe Leu Ile Gly Asn Leu Ala Leu Ser Asp Val Leu Met Cys Thr Ala
 20 25 30
 Cys Val Pro Leu Thr Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Pro Arg Gly Trp Val

101
35 40 45
Phe Gly Gly Gly Leu Cys His Leu Val Phe Phe Leu Gln Ala Val Thr
50 55 60
Val Tyr Val Ser Val Phe Thr Leu Thr Thr Ile Ala Val Asp Arg Tyr
65 70 75 80
Val Val Leu Val His Pro Leu Arg Arg Arg Ile Ser Leu Arg Leu Ser
85 90 95
Ala Tyr Ala Val Leu Ala Ile Trp Val Leu Ser Ala Val Leu Ala Leu
100 105 110
Pro Ala Ala Val His Thr Tyr His Val Glu Leu Lys Pro His Asp Val
115 120 125
Arg Leu Cys Glu Glu Phe Trp Gly Ser Gln Glu Arg Gln Arg Gln Leu
130 135 140
Tyr Ala Trp Gly Leu Leu Leu Val Thr Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Val
145 150 155 160
Ile Leu Leu Ser Tyr Ala Arg Val Ser Val Lys Leu Arg Asn Arg Val
165 170 175
Val Pro Gly Arg Val Thr Gln Ser Gln Ala Asp Trp Asp Arg Ala Arg
180 185 190
Arg Arg Arg Thr Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val Val Val
195 200 205

【0148】

【配列番号：23】

配列の長さ：126

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

配列

Val Val Leu Val His Pro Leu Arg Arg Arg Ile Ser Leu Arg Leu Ser
1 5 10 15
Ala Tyr Ala Val Leu Gly Ile Trp Ala Leu Ser Ala Val Leu Ala Leu
20 25 30
Pro Ala Ala Val His Thr Tyr His Val Glu Leu Lys Pro His Asp Val
35 40 45
Ser Leu Cys Glu Glu Phe Trp Gly Ser Gln Glu Arg Gln Arg Gln Ile
50 55 60
Tyr Ala Trp Gly Leu Leu Leu Gly Thr Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala
65 70 75 80
Ile Leu Leu Ser Tyr Val Arg Val Ser Val Lys Leu Arg Asn Arg Val
85 90 95
Val Pro Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Ala Asp Trp Asp Arg Ala Arg
100 105 110
Arg Arg Arg Thr Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val Val Val
115 120 125

【0149】

【配列番号：24】

配列の長さ：273

配列の型：核酸

※鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA特徴を決定した方法：S

※

配列

CTGGTGCTGG TGATCGCGCG GGTGCGCCGG CTGCACAACG TGACGAACCT CCTCATCGGC 60
AACCTGGCCT TGTCGACGT GTCATGTGC ACCGCCTGCG TGCCGCTCAC GCTGGCCTAT 120
GCCTTCGAGC CACGCGGCTG GGTGTTCCGC GCGCGCTGT GCCACCTGGT CTTCTTCCTG 180
CAGCCGGTCA CCGTCTATGT GTCGGTGTTC ACCTTCACCA CCATCGCAGT GGACCGGTAC 240

103

GTCGTGCTGG TGCACCCGCT GAGGCGGCGC ATC

104

273

【0150】

【配列番号：25】

配列の長さ：177

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

* 特徴を決定した方法：S

配列

GGCCTGCTGC TGGTCACCTA CCTGCTCCCT CTG
 CTGGTCA TCCTCCTGTC TTACGTCCGG 60
 GTGTCAAGTGA AGCTCCGCAA CCGCGTGGTG CCG
 GGCTGCG TGACCCAGAG CCAGGCCGAC 120
 TGGGACCGCG CTCGGCGCCG GCGCACCTTC TGC
 TTGCTGG TGGTGGTTCGT GGTGGTG 177

【0151】

【配列番号：26】

配列の長さ：1110

配列の型：核酸

※ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

※ 特徴を決定した方法：S

配列

ATGGCCTCAT CGACCACTCG GGGCCCCAGG GTT
 TCTGACT TATTTTCTGG GCTGCCGCCG 60
 GCGGTCACAA CTCCCGCCAA CCAGAGCGCA GAG
 GCCTCGG CGGGCAACGG GTCGGTGGCT 120
 GGCGCGGACG CTCCAGCCGT CACGCCCTTC CAG
 AGCCTGC AGCTGGTGCA TCAGCTGAAG 180
 GGGCTGATCG TGCTGCTCTA CAGCGTCGTG GTG
 GTCGTGG GGCTGGTGGG CAACTGCCTG 240
 CTGGTGCTGG TGATCGCGCG GGTGCGCCGG CTG
 CACAACG TGACGAACCTT CCTCATCGGC 300
 AACCTGGCCT TGTCGACGT GCTCATGTGC ACC
 GCCTGCG TGCCGCTCAC GCTGGCCTAT 360
 GCCTTCGAGC CACGCGGCTG GGTGTTCCGGC GGC
 GGCCTGT GCCACCTGGT CTTCTTCCTG 420
 CAGCCGGTCA CCGTCTATGT GTCGGTGTTT ACG
 CTCACCA CCATCGCAGT GGACCGCTAC 480
 GTCGTGCTGG TGCACCCGCT GAGGCGGCGC ATC
 TCGCTGC GCCTCAGCGC CTACGCTGTG 540
 CTGGCCATCT GGGCGCTGTC CGCGGTGCTG GCG
 CTGCCCC CCGCCGTGCA CACCTATCAC 600
 GTGGAGCTCA AGCCGCACGA CGTGCGCCTC TGC
 GAGGAGT TCTGGGGCTC CCAGGAGCGC 660
 CAGCGCCAGC TCTACGCCCTG GGGGCTGCTG CTG
 GTCACCT ACCTGCTCCC TCTGCTGGTC 720
 ATCCTCCTGT CTTACGTCCG GGTGTCAGTG AAG
 CTCCGCA ACCGCGTGGT GCCGGGCTGC 780
 GTGACCCAGA GCCAGGCCGA CTGGGACCGC GCT
 CGGCGCC GCGGCACCTT CTGCTTGCTG 840
 GTGGTGGTTCG TGGTGGTGTT CGCCGTCTGC TGG
 CTGCCGC TGCACGTCTT CAACCTGCTG 900
 CGGGACCTCG ACCCCACGC CATCGACCCT TAC
 GCCTTTG GGCTGGTGCA GCTGCTCTGC 960
 CACTGGCTCG CCATGA59TTC GGCCTGCTAC AAC

105

106

CCCTTCA TCTACGCCTG GCTGCACGAC 1020
 AGCTTCCGCG AGGAGCTGCG CAAACTGTTG GTC
 GCTTGGC CCCGCAAGAT AGCCCCCAT 1080
 GGCCAGAATA TGACCGTCAG CGTGGTCATC

1110

【0152】

【配列番号：27】

配列の長さ：618

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

* 特徴を決定した方法：S

配列

CTGGTGCTGG TGATCGCGCG GGTGCGCCGG CTG
 TACAACG TGACGAATTT CCTCATCGGC 60
 AACCTGGCCT TGTCCGACGT GCTCATGTGC ACC
 GCCTGCG TGCCGCTCAC GCTGGCCTAT 120
 GCCTTCGAGC CACGCGGCTG GGTGTTTCGGC GGC
 GGCCTGT GCCACCTGGT CTTCTTCCTG 180
 CAGGCGGTCA CCGTCTATGT GTCGGTGTTC ACG
 CTCACCA CCATCGCAGT GGACCGCTAC 240
 GTCGTGCTGG TGCACCCGCT GAGGCGGCGC ATC
 TCGCTGC GCCTCAGCGC CTACGCTGTG 300
 CTGGCCATCT GGGTGCTGTC CGCGGTGCTG GCG
 CTGCCCCG CCGCGGTGCA CACCTATCAC 360
 GTGGAGCTCA AGCCGCACGA CGTGCGCCTC TGC
 GAGGAGT TCTGGGGCTC CCAGGAGCGC 420
 CAGCGCCAGC TCTACGCCTG GGGGCTGCTG CTG
 GTCACCT ACCTGCTCCC TCTGCTGGTC 480
 ATCCTCCTGT CTTACGCCCG GGTGTCAGTG AAG
 CTCCGCA ACCGCGTGGT GCCGGGCGCG 540
 GTGACCCAGA GCCAGGCCGA CTGGGACCGC GCT
 CGGCGCC GGCGCACCTT CTGCTTGCTG 600
 GTGGTGGTGC TGGTGGTG

618

【0153】

【配列番号：28】

配列の長さ：378

配列の型：核酸

※ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

※ 特徴を決定した方法：S

配列

GTGGTCTGG TGCACCGCT ACGTCGGCG ATTTACTGA GGCTCAGCG CTACGCGTG 60
 CTGGGCATCT GGGCTCTATC TGCACTGCTG GCGCTGCCG CCGCGGTGCA CACCTACCAT 120
 GTGGAGCTCA AGCCCCAGA CGTAGCCTC TGCAGGAGT TCTGGGGCTC GCAGGAGCGC 180
 CAACGCCAGA TCTACGCTG GGGGCTGCTT CTGGGCACCT ATTTGCTCCC CCTGCTGGCC 240
 ATCCTCCTGT CTTACGTACG GGTGTCAGTG AAGCTGAGGA ACCGCGTGGT GCCTGGCAGC 300
 GTGACCCAGA GTCAAGCTGA CTGGGACCGA GCGCGTCGCC GCCGCACTTT CTGTCTGCTG 360
 GTGGTGGTGG TGGTAGTG 378

【0154】

【配列番号：29】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGTGGSCMTS STGGGCAACN YCCTG

25

【0155】

【配列番号：30】

★50 配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTNGWRRGGC ANCCAGCAGA KGGCAAA 27

【0156】

【配列番号：31】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGTGYGYSA TYGCNNTKGA YMGSTAC 27

【0157】

【配列番号：32】

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AKGWAGWAGG GCAGCCAGCA GANSRYGAA 29

【0158】

【配列番号：33】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGACTTATT TTCTGGGCTG CCGC 24

【0159】

【配列番号：34】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AACACCGACA CATAGACGGT GACC 24

【0160】

【配列番号：35】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCICAYCARC AYTGYATGGA 20

【0161】

【配列番号：36】

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

10 CCIACGGGIC KDATGCCICK GCCIGC 26

【0162】

【配列番号：37】

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACGGGCCCKDA TGCCICKGCC IGCRTA 26

20 【0163】

【配列番号：38】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCGGCGTACC AGGCAGGGTT 20

【0164】

30 【配列番号：39】

配列の長さ：28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGGCAGGGTT GATGTCGGGG GTGCGGAT 28

【0165】

【配列番号：40】

40 配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGCCAGCAG AGCCCACCAG CAC
TCCA 27

【0166】

【配列番号：41】

50 配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGGGGGGCCT GGCTCCTCTG CCT
GCTG 27

【0167】

【配列番号：42】

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTGTCGACGA ATGAAGGCGG TGGGGGCCTG GC 32

配列

Met	Lys	Ala	Val	Gly	Ala	Trp	Leu	Leu
Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu		
1				5				

10					15			
Ala	Leu	Gln	Gly	Ala	Ala	Ser	Arg	Ala
His	Gln	His	Ser	Met	Glu	Ile		
			20					25

				30				
Arg	Thr	Pro	Asp	Ile	Asn	Pro	Ala	Trp
Tyr	Ala	Gly	Arg	Gly	Ile	Arg		
		35					40	

			45					
Pro	Val	Gly	Arg	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg
Ala	Ala	Leu	Gly	Asp	Gly	Pro		
	50					55		

		60						
Arg	Pro	Gly	Pro	Arg	Arg	Val	Pro	Ala
Cys	Phe	Arg	Leu	Glu	Gly	Gly		
65					70			

	75				80			
Ala	Glu	Pro	Ser	Arg	Ala	Leu	Pro	Gly
Arg	Leu	Thr	Ala	Gln	Leu	Val		
				85				

90								
Gln	Glu							

【0170】

【配列番号：45】

配列の長さ：83

配列

Met	Ala	Leu	Lys	Thr	Trp	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu	Val
1			5				10					15		
Leu	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	His	Gln	His	Ser	Met	Glu	Thr
			20				25	30						

* 【0168】

【配列番号：43】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGGCTCCCGC TGTTATTCCT GGA
10 C 24

【0169】

【配列番号：44】

配列の長さ：98

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

※配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：ペプチド

111

112

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro
 35 40 45
 Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Thr Pro Arg Asp Val Thr Gly
 50 55 60
 Leu Gly Gln Leu Ser Cys Leu Pro Leu Asp Gly Arg Thr Lys Phe Ser
 65 70 75 80
 Gln Arg Gly

【0171】

【配列番号：46】

配列の長さ：249

配列の型：核酸

* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：cDNA

* 特徴を決定した方法：S

配列

ATGGCCCTGA AGACGTGGCT TCTGTGCTTG CTGCTGCTAA GCTTGGTCCT CCCAGGGGCT 60
 TCCAGCCGAG CCCACCAGCA CTCCATGGAG ACAAGAACC CTGATATCAA TCCTGCCTGG 120
 TACACGGGCC GCGGGATCAG GCCTGTGGGC CGCTTCGGCA GGAGAAGGGC AACCCCGAGG 180
 GATGTCACTG GACTTGGCCA ACTCAGCTGC CTCCCCTGG ATGGACGCAC CAAGTTCTCT 240
 CAGCGTGG 249

【0172】

【配列番号：47】

配列の長さ：31

※配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※20 配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn
 1 5 10 15
 Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe
 20 25 30

【0173】

【配列番号：48】

配列の長さ：32

★配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn
 1 5 10 15
 Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly
 20 25 30

【0174】

【配列番号：49】

配列の長さ：33

☆配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu
 Thr Arg Thr Pro Asp Ile Asn
 1 5
 10 15
 Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile
 Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly
 20 25
 30
 Arg

【0175】

【配列番号：50】

配列の長さ：20

◆配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：ペプチド

配列

50

113114

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr
 Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro
 1 5
 10 15
 Val Gly Arg Phe
 20

【0176】

【配列番号：51】

配列の長さ：21

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro
 1 5 10 15
 Val Gly Arg Phe Gly
 20

【0177】

【配列番号：52】

配列の長さ：22

※ 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Thr Gly Arg Gly Ile Arg Pro
 1 5 10 15
 Val Gly Arg Phe Gly Arg
 20

【0178】

【配列番号：53】

配列の長さ：93

配列の型：核酸

★ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

★ 特徴を決定した方法：S

配列

AGCCGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGACA AGAACCCCTG ATATCAATCC TGCCTGGTAC 60
 ACGGGCCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTC 93

【0179】

【配列番号：54】

配列の長さ：96

配列の型：核酸

☆ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

☆ 特徴を決定した方法：S

配列

AGCCGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGACA AGAACCCCTG ATATCAATCC TGCCTGGTAC 60
 ACGGGCCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTCGGC 96

【0180】

【配列番号：55】

配列の長さ：99

配列の型：核酸

◆ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

◆ 40 特徴を決定した方法：S

配列

AGCCGAGCCC ACCAGCACTC CATGGAGACA AGAACCCCTG ATATCAATCC TGCCTGGTAC 60
 ACGGGCCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTCGGCAGG 99

【0181】

【配列番号：56】

配列の長さ：60

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

ACCCCTGATA TCAATCCTGC CTGGTACACG GGCCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60

【0182】

50 【配列番号：57】

配列の長さ: 63

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

* トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

* 特徴を決定した方法: S

配列

ACCCCTGATA TCAATCCTGC CTGGTACACG GGC
CGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60
GGC

63

【0183】

【配列番号: 58】

配列の長さ: 66

配列の型: 核酸

※ 鎖の数: 二本鎖

10 トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

※ 特徴を決定した方法: S

配列

ACCCCTGATA TCAATCCTGC CTGGTACACG GGC
CGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60
GGCAGG

66

【0184】

【配列番号: 59】

配列の長さ: 87

★ 配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

★ 20 配列の種類: ペプチド

配列

Met Lys Val Leu Arg Ala Trp Leu Leu Cys Leu Leu Met Leu Gly Leu
1 5 10 15
Ala Leu Arg Gly Ala Ala Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile
20 25 30
Arg Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg
35 40 45
Pro Val Gly Arg Phe Gly Arg Arg Arg Ala Thr Leu Gly Asp Val Pro
50 55 60
Lys Pro Gly Leu Arg Pro Arg Leu Thr Cys Phe Pro Leu Glu Gly Gly
65 70 75 80
Ala Met Ser Ser Gln Asp Gly
85

【0185】

【配列番号: 60】

配列の長さ: 261

配列の型: 核酸

☆ 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

☆ 特徴を決定した方法: S

配列

ATGAAGTGC TGAGGGCCTG GCTCCTGTGC CTGCTGATGC TGGGCCTGGC CTTGCGGGGA 60
GCTGCAAGTC GTACCCATCG GCACTCCATG GAGATCCGCA CCCCTGACAT CAATCCTGCC 120
TGGTACGCCA GTCGCGGGAT CAGGCCTGTG GGCCGCTTTC GTCCGAGGAG GGCAACCCTG 180
GGGACGTCC CCAAGCCTGG CCTGCGACCC CGGCTGACCT GTTCCCCCT GGAAGCGGT 240
GCTATGTCGT CCCAGGATGG C 261

【0186】

【配列番号: 61】

配列の長さ: 31

◆ 配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

◆ 配列の種類: ペプチド

配列

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn
1 5 10 15
Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe

117

20

25

30

【0187】

【配列番号：62】

配列の長さ：32

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn
 1 5 10 15
 Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly
 20 25 30

【0188】

【配列番号：63】

配列の長さ：33

※ 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：ペプチド

配列

Ser Arg Thr His Arg His Ser Met Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn
 1 5 10 15
 Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro Val Gly Arg Phe Gly
 20 25 30

Arg

【0189】

【配列番号：64】

配列の長さ：20

★ 配列の型：アミノ酸

20 トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro
 1 5 10 15
 Val Gly Arg Phe
 20

【0190】

【配列番号：65】

配列の長さ：21

☆ 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro
 1 5 10 15
 Val Gly Arg Phe Gly
 20

【0191】

【配列番号：66】

配列の長さ：22

◆ 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：ペプチド

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Ser Arg Gly Ile Arg Pro
 1 5 10 15
 Val Gly Arg Phe Gly Arg
 20

【0192】

【配列番号：67】

配列の長さ：93

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

特徴を決定した方法：S

配列

AGTCGTACCC ATCGGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCTG ACATCAATCC TGCCTGGTAC 60
 GCCAGTCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTC 93

【0193】

50 【配列番号：68】

配列の長さ: 96

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

配列

AGTCGTACCC ATCGGCACTC CATGGAGATC CGCACCCCTG ACATCAATCC TGCCTGGTAC 60
GCCAGTCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTCGGT 96

【0194】

【配列番号: 69】

配列の長さ: 99

配列の型: 核酸

配列

AGTCGTACCC ATCGGCACTC CATGGAGATC CGC
ACCCCTG ACATCAATCC TGCCTGGTAC 60
GCCAGTCGCG GGATCAGGCC TGTGGGCCGC TTC
GGTCGG 99

【0195】

【配列番号: 70】

配列の長さ: 60

配列の型: 核酸

配列

ACCCCTGACA TCAATCCTGC CTGGTACGCC AGT
CGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60

【0196】

【配列番号: 71】

配列の長さ: 63

配列の型: 核酸

配列

ACCCCTGACA TCAATCCTGC CTGGTACGCC AGTCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60
GGT 63

【0197】

【配列番号: 72】

配列の長さ: 66

配列の型: 核酸

配列

ACCCCTGACA TCAATCCTGC CTGGTACGCC AGTCGCGGGA TCAGGCCTGT GGGCCGCTTC 60
GGTCGG 66

【0198】

【配列番号: 73】

配列の長さ: 21

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列

Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Xaa Xaa Arg Gly Ile Arg Pro
1 5 10 15
Val Gly Arg Phe Xaa
20

【0199】

【配列番号: 74】

配列の長さ: 11

配列の型: アミノ酸

* トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

* 特徴を決定した方法: S

※ 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

※10 特徴を決定した方法: S

★ 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

★ 特徴を決定した方法: S

☆ 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

☆ 特徴を決定した方法: S

◆ 鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA

◆ 特徴を決定した方法: S

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 第10番目のXaaはAlaもしくはThr、第11番目のXaaはGlyもしくはSer、第21番目のXaaはH、GlyもしくはGlyArgを示す。

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: 第3番目のXaaはAlaもしくはThr、第5番目のXaaはGlnもしくはArg、第10番目のXaaはIleもし

くはThrを示す。

配列

Ser Arg Xaa His Xaa His Ser Met Glu
Xaa Arg

1

5

10

【0200】

【配列番号：75】

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CARCAITCCA TGGAGACAAG AAC
CCC 26

【0201】

【配列番号：76】

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TACCAGGCAG GATTGATACA GGGG 24

【0202】

【配列番号：77】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCATCATCC AGGAAGACGG AGC
AT 25

【0203】

【配列番号：78】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCAGAGGAG AGGGAGGGTA GAG
GA 25

【0204】

【配列番号：79】

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

10 ACGTGGCTTC TGTGCTTGCT GC 22

【0205】

【配列番号：80】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCCTGATCCC GCGGCCCGTG TAC
CA 25

【0206】

【配列番号：81】

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTGCCCTTCT CCTGCCGAAG CGG
CCC 26

【0207】

【配列番号：82】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCGGGGCT GCAAGTCGTA CCATCG 27

40 【0208】

【配列番号：83】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGGCACTCCA TGGAGATCCG CAC
CCCT 27

*50 【0209】

【配列番号：84】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAGGCAGGAT TGATGTCAGG GGT
GCGG 27

【0210】

【配列番号：85】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CATGGAGTGC CGATGGGTAC GACTTGC 27

【0211】

【配列番号：86】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCCTCCTCG GAGGAGCCAA GGG
ATGA 27

【0212】

【配列番号：87】

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGAAAGGAG CCCGAAGGAG AGG
AGAG 27

【0213】

【配列番号：88】

配列の長さ：25

配列

Ser Arg Ala His Gln His Ser Met Glu
Ile Arg Thr Pro Asp Cys

1

5

10

15

【0218】

【配列番号：93】

配列の長さ：15

配列

* 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCTGCTGGCC ATTCTCCTGT CTAC 25

【0214】

【配列番号：89】

配列の長さ：25

10 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGTCCAGGT CCCGCAGAAG GTT
GA 25

【0215】

【配列番号：90】

配列の長さ：25

20 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GAAGACGGAG CATGGCCCTG AAG
AC 25

【0216】

【配列番号：91】

配列の長さ：25

30 配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGCAGCTGAG TTGGCCAAGT CCACT 25

【0217】

【配列番号：92】

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

40 トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

※ 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：ペプチド

Cys	Ala	Trp	Tyr	Ala	Gly	Arg	Gly	Ile
Arg	Pro	Val	Gly	Arg	Phe			
1				5				
10					15			

【0219】

【配列番号：9.4】

配列の長さ：15

配列

Cys Glu Ile Arg Thr Pro Asp Ile Asn Pro Ala Trp Tyr Ala Gly
1 5 10 15

【 0 2 2 0 】

【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト下垂体由来cDNAを用いてPCR法によって単離したcDNAクローンp19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。配列決定に用いたプライマーは-21M13である。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図2】ヒト下垂体由来cDNAを用いてPCR法によって単離したcDNAクローンp19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。配列決定に用いたプライマーはM13RV-N(タカラ)である。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図3】図1に示したアミノ酸配列をもとに作成した、p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の部分疎水性プロットを示す。

【図4】図2に示したアミノ酸配列をもとに作成した、p19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の部分疎水性プロットを示す。

【図5】図1および図2に示したp19P2に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の部分アミノ酸配列を、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるS12863と比較した図を示す。黒く塗った部分は一致している部分を示す。p19P2の第1番目～第99番目のアミノ酸配列は図1の第1番目～第99番目のアミノ酸配列に対応し、第156番目～第230番目のアミノ酸配列は図2の第1番目～第68番目のアミノ酸配列に対応する。

【図6】MIN6由来cDNAを用いてPCR法によって単離したcDNAクローンpG3-2およびpG1-10にそれぞれ含まれるMIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列に基づいて導き出したMIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるア

* 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：ペプチド

※ミノ酸配列を示す。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図7】図6に示したM1N6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列(pG3-2/pG1-10)を、図1および図2に示したp19P2にコードされる蛋白質の部分アミノ酸配列と比較した図を示す。黒塗りの部分は配列が一致している部分を示す。p19P2の第1番目～第99番目のアミノ酸配列は図1の第1番目～第99番目のアミノ酸配列に対応し、第156番目～第223番目のアミノ酸配列は図2の第1番目～第68番目のアミノ酸配列に対応する。pG3-2/pG1-10の第1番目～第223番目のアミノ酸配列は図6の第1番目～第223番目のアミノ酸配列に対応する。

【図8】図6に示した部分アミノ酸配列をもとに作成した、M1N6由来のG蛋白質共役型セプター蛋白質の部分疎水性プロットを示す。

【図9】 p19P2に挿入されているDNA断片をプローブとして用いて、ヒト下垂体由来cDNAライブラリーよりブランクハイブリダイゼーション法によって単離したcDNAクローンphGR3に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAの全塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。

【図10】ヒト下垂体由来のcDNAクローンp hGR3がコードするレセプター遺伝子のヒト下垂体mRNAに対するノーザンブロットの結果を示す。

【図11】図9に示したアミノ酸配列をもとに作成した、pHGR3に含まれるヒト下垂体由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAにコードされる蛋白質の疎水性プロットを示す。

【図12】MIN6由来cDNAを用いてPCR法によって単離したcDNAクローンp5S38に含まれるMIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。下線で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図13】図12に示したMIN6由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列(p5S38)を、図1および図2に示したp19P2に含まれるcDNA断片にコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質

※ 50

質の部分アミノ酸配列、および図6に示したpG3-2ならびにpG1-10にそれぞれ含まれるcDNA断片の塩基配列から導きだした塩基配列にコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分アミノ酸配列と比較した図を示す。黒塗りの部分は配列が一致している部分を示す。p5S38の第1番目～第144番目のアミノ酸配列は図12の第1番目～第144番目のアミノ酸配列に対応する。p19P2の第1番目～第99番目のアミノ酸配列は図1の第1番目～第99番目のアミノ酸配列に対応し、第156番目～第223番目のアミノ酸配列は図2の第1番目～第68番目のアミノ酸配列に対応する。pG3-2/pG1-10の第1番目～第223番目のアミノ酸配列は図6の第1番目～第223番目のアミノ酸配列に対応する。

【図14】図12に示した部分アミノ酸配列をもとに作成した、p5S38に含まれるMIN6由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の部分疎水性プロットを示す。

【図15】pAKKO-19P2を導入したCHO細胞でmRNAが発現していることを確認するためにRT-PCRを行った。レーン1から7は比較のためにpAKKO-19P2を段階的に希釈してPCRを行ったもので、10 μ g/ μ lのプラスミドをそれぞれ原液(レーン1)、1/2希釈(レーン2)、1/4希釈(レーン3)、1/64希釈(レーン4)、1/256希釈(レーン5)、1/1024希釈(レーン6)、1/4096希釈(レーン7)した鋳型を使ってPCRを行ったものについて1.2%アガロースゲル電気泳動により解析した結果である。レーン8から11はCHO-19P2細胞株から調製したcDNAをそれぞれ1/10希釈(レーン8)、1/100希釈(レーン9)、1/1000希釈(レーン10)したものを鋳型としてPCRを行ったものを電気泳動した。レーン11はcDNAの合成をreverse transcriptaseなしで行ったものを鋳型としてPCRを行ったものを電気泳動した。レーン12および13はそれぞれmock CHO細胞からreverse transcriptase添加および無添加で調製したcDNAを鋳型としてPCRを行ったものを電気泳動した。MはDNAのサイスマーカーであり両端のレーンは λ /Sty I digest(ニッポンジーン)を右から2番目は ϕ x174/Hinc II digest(ニッポンジーン)をそれぞれ1 μ gを電気泳動した。矢印は約400bpのPCRにより増幅されたバンドの位置を示している。

【図16】ラット全脳から抽出した粗リガンドペプチド画分についてCHO-19P2細胞株からのアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。アラキドン酸代謝物の遊離促進活性は0.05%BSAを含むHBSSを加えた時に遊離された³Hアラキドン酸代謝物の量を100%として、リガンドペプチド粗画分を加えた時に放出されるアラキドン酸代謝物の量を%として表した。30%CH₃CNの画分にCHO-19P2細胞株からアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が認められた。

【図17】ウシ視床下部から抽出した粗リガンドペプチ

ド画分についてCHO-19P2細胞株からのアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。アラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性は0.05%BSAを含むHBSSを加えた時に遊離された³Hアラキドン酸代謝物の量を100%として、リガンドペプチド粗画分を加えた時に放出されるアラキドン酸代謝物の量を%として表した。ラット全脳から抽出した粗リガンドペプチド画分と同様に30%CH₃CNの画分にCHO-19P2細胞株からアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性が認められた。

10 【図18】逆相カラムC18 218TP5415で精製した画分についてCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。RESOURCE Sの活性画分をC18 218TP5415で分離した。流速1ml/min、20%-30%CH₃CN/0.1%TFA/H₂Oの濃度勾配でクロマトグラフィーを行い、溶出液を1mlずつ分取し、凍結乾燥後、各フラクションに含まれるCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離促進活性を測定した。その結果、活性は、3つ(溶出順にそれぞれP-1、P-2、P-3と呼ぶ)に分離した。

20 【図19】逆相カラムdiphenyl 219TP5415で精製した画分についてCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。C18 218TP5415のP-3活性画分をdiphenyl 219TP5415で分離した。流速1ml/min、22%-25%CH₃CN/0.1%TFA/H₂Oの濃度勾配でクロマトグラフィーを行い、溶出液を1mlずつ分取し、凍結乾燥後、各フラクションに含まれるCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離促進活性を測定した。その結果、活性は1つのピークに収束した。

30 【図20】逆相カラム μ RPC C2/C18 SC 2.1/10で精製した画分についてCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。diphenyl 219TP5415で活性と一致したピークの画分を μ RPC C2/C18 SC 2.1/10で分離した。流速100 μ l/min、22%-23.5%CH₃CN/0.1%TFA/H₂Oの濃度勾配でクロマトグラフィーを行い、溶出液を100 μ lずつ分取し、凍結乾燥後、各フラクションに含まれるCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離促進活性を測定した。その結果、活性は単一の物質(ペプチド)と思われる二つのピークに一致した。

40 【図21】逆相カラム μ RPC C2/C18 SC 2.1/10で精製したP-2画分についてCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。流速100 μ l/min、21.5%-23.0%CH₃CN/0.1%TFA/蒸留水の濃度勾配でクロマトグラフィーを行い、溶出液を100 μ lずつ分取し、凍結乾燥後、各フラクションに含まれるCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進する活性を測定した。その結果、活性は、単一の物質(ペプチド)と思われるペプチドのピークに一致した。

50 【図22】ウシ視床下部由来cDNAを用いてPCR法

によって単離したcDNAクローンに含まれるウシ視床下部由来のCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進するリガンドポリペプチドcDNA断片の塩基配列に基づいて導き出した該ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドcDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。矢印で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図23】ウシ視床下部由来cDNAを用いてPCR法によって単離したcDNAクローンに含まれるウシ視床下部由来のCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進するリガンドポリペプチドcDNA断片の塩基配列に基づいて導き出した該ウシ視床下部由来リガンドポリペプチドcDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。矢印で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図24】ウシ視床下部由来のCHO-19P2細胞株から特異的にアラキドン酸代謝物の遊離を促進するリガンドポリペプチドのアミノ酸配列(a)、(b)および配列番号:1、配列番号44に示したリガンドポリペプチドの全コード領域をコードするcDNA配列である。

【図25】合成リガンドポリペプチド(19P2-L31)についてCHO-19P2細胞株からの特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性を濃度依存的に測定した。合成ペプチドは、脱気処理した蒸留水に 10^{-3} Mの濃度で溶解し、0.05%BSAを含むHBSSで 10^{-6} M $\sim 10^{-9}$ Mの濃度に希釈した。アラキドン酸代謝物遊離活性は、希釈液を細胞に添加した時に上清に遊離される 3 Hアラキドン酸代謝物の実測放射線量で表した。

その結果、19P2-L31によるCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性が濃度依存的に認められた。

【図26】合成リガンドポリペプチド(19P2-L31(O))についてCHO-19P2細胞株からの特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性を濃度依存的に測定した。合成リガンドポリペプチドは、脱気処理した蒸留水に 10^{-3} Mの濃度で溶解し、0.05%BSAを含むHBSSで 10^{-6} M $\sim 10^{-9}$ Mの濃度に希釈した。アラキドン酸代謝物遊離活性は、希釈液を細胞に添加した時に上清に遊離される 3 Hアラキドン酸代謝物の実測放射線量で表した。その結果、19P2-L31(O)によるCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性が濃度依存的に認められた。

【図27】合成リガンドポリペプチド19P2-L20についてCHO-19P2細胞株からの特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性を濃度依存的に測定した。合成ペプチドは、脱気処理した蒸留水に 10^{-3} Mの濃度で溶解し、0.05%BSAを含むHBSSで 10^{-6} M $\sim 10^{-9}$ Mの濃度に希釈した。アラキドン酸代謝物遊離活性は、希釈液を細胞に添加した時に上清に遊離される 3 Hアラキドン酸代謝物の実測放射線量で表した。その

結果、19P2-L20によるCHO-19P2細胞株に特異的なアラキドン酸代謝物遊離活性が濃度依存的に認められた。

【図28】ウシゲノムライブラリーよりクローン化したファージのDNAを制限酵素BamHI(B)およびSalI(S)で切断し、1.2%アガロースゲル電気泳動を行ったパターンを示す。DNAのサイズマーカー(M)には入ファージDNAのStyl消化物を用いた。Bのレーンではマーカーの1番目(19,329bp)と2番目(7,743bp)のバンドの間に相当する位置にベクター由来の2本のバンドが検出され、その他に3番目(6,223bp)から5番目(3,472bp)の間に挿入断片由来の3本のバンドが検出された。Sのレーンでは同じくベクター由来の2本のバンドが検出されているが、挿入断片由来のバンドが重なっているために上側のバンドがBのレーンに比べて太くなっている。

【図29】ウシゲノムDNAから解読したコード領域付近の塩基配列を示す。1~3番目の塩基(ATG)が翻訳開始コドンに相当し、767~769番目の塩基(TAA)が翻訳終止コドンに相当する。

【図30】ウシゲノムDNAから解読したコード領域付近の塩基配列(genome)をPCR法によってクローニングしたウシcDNAの塩基配列(cDNA)と比較した結果を示す。配列の一致している部分は網掛けで示した。101番目~572番目の部分はcDNAの塩基配列には相当する部分が無く、イントロンであることが判明した。

【図31】ウシゲノムDNAから解読したコード領域付近の塩基配列からイントロン部分を除き、コードされるアミノ酸配列に翻訳した結果を示す。

【図32】ラット型リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列および全コード領域をコードするcDNA配列である。

【図33】ウシ型リガンドポリペプチドのアミノ酸配列およびウシ型ポリペプチド、ラット型ポリペプチドをコードするDNAの塩基配列を示す。矢印で示した部分は合成プライマーに相当する部分である。

【図34】ヒト型リガンドポリペプチドの全長アミノ酸配列および全コード領域をコードするcDNA配列である。

【図35】ウシ型リガンドポリペプチド、ラット型リガンドポリペプチドおよびヒト型リガンドポリペプチドの翻訳領域についてアミノ酸配列を比較したものである。

【図36】生細胞におけるヨードラベル化リガンドポリペプチドを用いたレセプター結合実験の結果を示す。

【図37】CHO-19P2-9およびCHO-UHR1におけるリガンドポリペプチドによるアラキドン酸代謝物遊離活性の測定結果を示す。

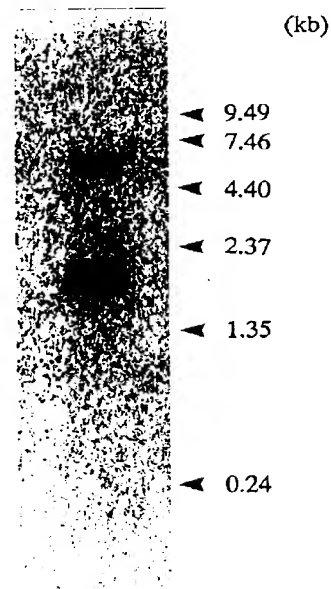
【図38】ラット組織におけるUHR-1のRT-PCRによる定量結果を示す。定量値は3回のPCRの平均値S.E.M.で表した。

【図 4 5】 3mg/kgのレセルピンを皮下投与した15時間後のマウスにリガンドポリペプチドを脳室内投与したときの体温変化を測定した結果を示す。図中、一つの星印は危険率： $p \leq 0.05$ 、二つの星印は $p \leq 0.01$ を示す。*

【図52】発現ベクターpAKKO-UHR-1上で構築されたラットUHR-1の完全なコード領域の塩基配列と、それにコードされるアミノ酸配列を示す。

【图 10】

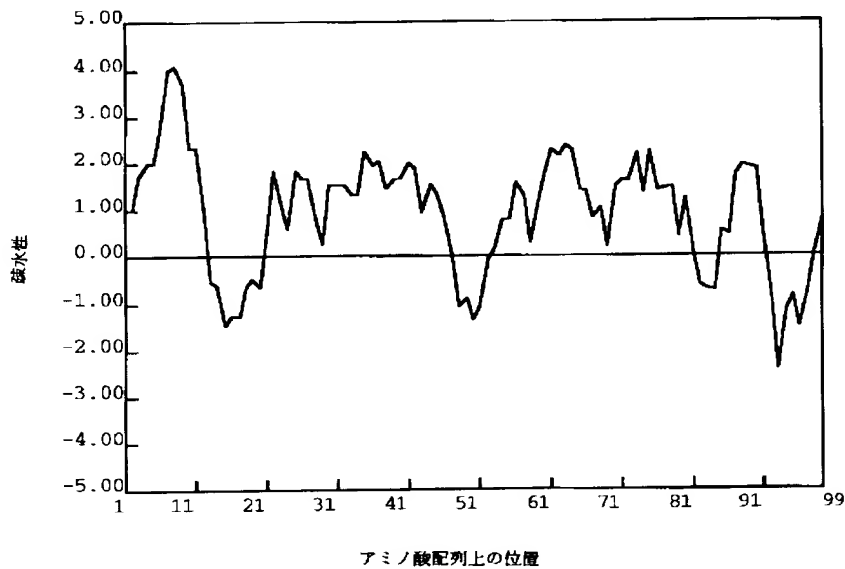
5'	9			18			27			36			45			54				
	GTG	GGC	ATG	GTG	GGC	AAC	GTC	CTG	CTG	GTG	CTG	GTG	ATC	GCG	CGG	GTG	CGC	CGG		
	Val	Gly	Met	Val	Gly	Asn	Val	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Ile	Ala	Arg	Val	Arg	Arg		
	<u>63</u>			<u>72</u>			<u>81</u>			<u>90</u>			<u>99</u>			<u>108</u>				
	CTG	CAC	AAC	GTG	AAG	AAC	TTC	CTC	ATC	GGC	AAC	CTG	GCC	TTC	TCC	GAC	GTG	CTC		
	Leu	His	Asn	Val	Thr	Asn	Phe	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Val	Leu		
	117			126			135			144			153			162				
	ATG	TGC	AAC	GCC	TGC	GTG	CCG	CTC	ACG	CTG	GCC	TAT	GCC	TTC	GAG	CCA	CGC	GGC		
	Met	Cys	Thr	Ala	Cys	Val	Pro	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Glu	Pro	Arg	Gly		
	171			180			189			198			207			216				
	TGG	GTG	TTC	GGC	GGC	CTG	TGC	CAC	CTG	GTC	TTC	TTC	CTG	CTG	CCG	GTC	CTC	GGC		
	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Leu	Cys	His	Leu	Val	Phe	Phe	Leu	Gln	Pro	Val	Thr		
	225			234			243			252			261			270				
	GTC	TAT	GTG	TGC	GTG	TTC	AAC	CTC	ACC	ACC	ATC	GCA	GTG	GAC	CGG	TAC	GTC	GTG		
	Val	Tyr	Val	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Thr	Thr	Ile	Ala	Val	Asp	Arg	Tyr	Val	Val		
	279			288			297													
	CTG	GTG	CAC	CCG	CTG	AGG	CGG	CGC	ATC	3'										
	Leu	Val	His	Pro	Leu	Arg	Arg	Arg	Ile											



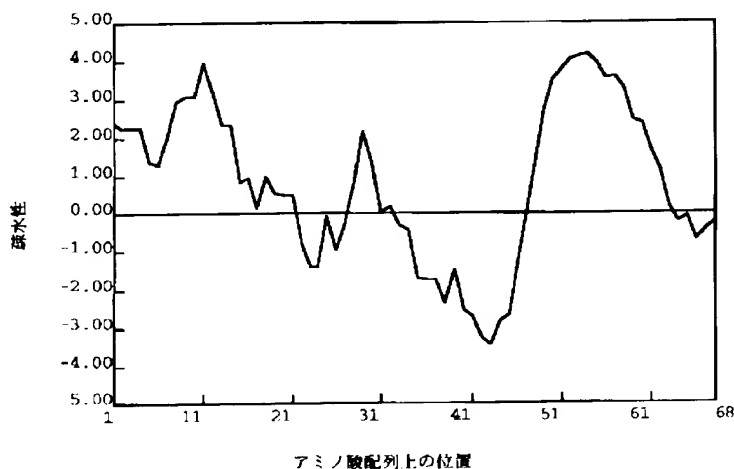
【図2】

5'	GGC	CTG	CTG	CTG	GTC	ACC	TAC	CTG	CTC	CCT	CTG	CTG	GTC	ATC	CTC	CTG	TCT	TAC	
	Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Tyr	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Ile	Leu	Leu	Ser	Tyr	
	GTC	CGG	GTC	TCA	GTC	AAG	CTC	CGC	AAC	CGC	GTC	GTC	CCG	GGC	TGC	GTC	ACC	CAG	
	Val	Arg	Val	Ser	Val	Lys	Leu	Arg	Asn	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Cys	Val	Thr	Gln	
	AGC	CAG	GCC	GAC	TGG	GAC	CGC	GCT	CGG	CGC	CGG	CGC	ACC	TTC	TGC	TTG	CTG	GTG	
	Ser	Gln	Ala	Asp	Trp	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Phe	Cys	Leu	Leu	Val	
	GTG	GTC	GTC	GTC	GTC	TTT	GCC	ATC	TGC	TGG	TTG	CCT	TAC	TAC					
	Val	Val	Val	Val	Val	<u>Phe</u>	<u>Ala</u>	<u>Ile</u>	<u>Cys</u>	<u>Trp</u>	<u>Leu</u>	<u>Pro</u>	<u>Tyr</u>	<u>Tyr</u>					

【図3】



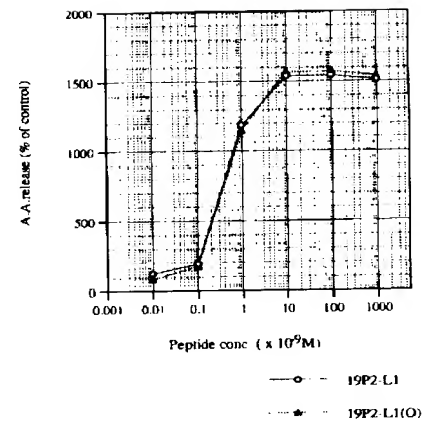
【図4】



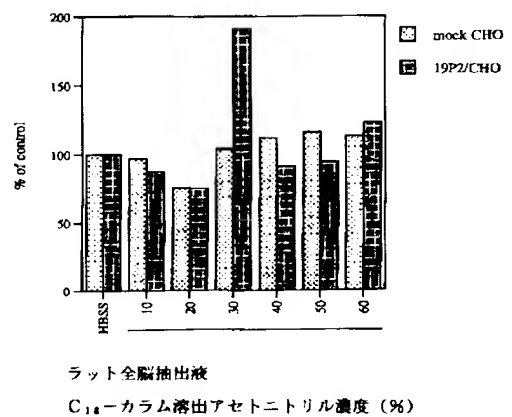
【図15】



【図26】



【図16】

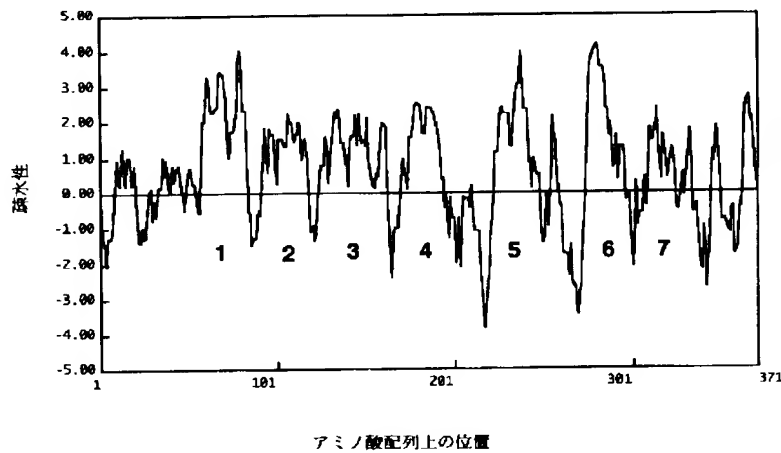


		9		18		27		36		45		54					
GTG	GCG	ATG	GTG	GCG	AAC	ATC	CTG	CTG	CTG	ATC	GCG	GGG	GTG	CGC	CAG		
Val	Gly	Met	Val	Gly	Asn	Ile	Leu	Leu	Val	Ile	Ala	Arg	Val	Arg	Arg		
		63		72		81		90		99		108					
CTG	TAC	AAC	GTG	ACG	AAT	TTC	CTC	ATC	GCG	AAC	CTG	GCC	TTC	GAC	GTG	CTC	
Leu	Tyr	Asn	Val	Thr	Asn	Phe	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Val	Leu
		117		126		135		144		153		162					
ATG	TGC	ACC	GCG	TGC	GTG	CCG	CTC	ACG	CTG	GCC	TAT	GCC	TTC	GAG	CCA	CGC	GGC
Met	Cys	Thr	Ala	Cys	Val	Pro	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Glu	Pro	Arg	Gly
		171		180		189		198		207		216					
TGG	GTG	TTC	GCG	GCG	GCG	CTG	TGC	CAC	CTG	GTC	TTC	TTC	CTG	CAG	GCG	GTC	ACC
Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Leu	Cys	His	Leu	Val	Phe	Phe	Leu	Gln	Ala	Val	Thr
		225		234		243		252		261		270					
GTC	TAT	GTG	TGG	GTG	TTC	ACG	CTC	ACC	ACC	ATC	GCA	GTG	GAC	CGC	TAC	GTC	GTG
Val	Tyr	Val	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Thr	Thr	Ile	Ala	Val	Asp	Arg	Tyr	Val	Val
		279		288		297		306		315		324					
CTG	GTG	CAC	CCG	CTG	AGG	CGG	CGC	ATC	TGG	CTG	CGC	CTC	AGC	GCC	TAC	GCT	GTG
Leu	Val	His	Pro	Leu	Arg	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ala	Val
		333		342		351		360		369		378					
CTG	GCC	ATC	TGG	GTG	CTG	TCC	GCG	GTG	CTG	GCG	CTG	CCC	GCC	GCC	GTG	CAC	ACC
Leu	Ala	Ile	Trp	Val	Leu	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	His	Thr
		387		396		405		414		423		432					
TAT	CAC	GTG	GAG	CTC	AAG	CCG	CAC	GAC	GTG	CGC	CTC	TGC	GAG	GAG	TTC	TGG	GGC
Tyr	His	Val	Glu	Leu	Lys	Pro	His	Asp	Val	Arg	Leu	Cys	Glu	Glu	Phe	Trp	Gly
		441		450		459		468		477		486					
TCC	CAG	GAG	CCG	CAG	CGC	CAG	CTC	TAC	GCC	TGG	GGG	CTG	CTG	CTG	GTC	ACC	TAC
Ser	Gln	Glu	Arg	Gln	Arg	Gln	Leu	Tyr	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Tyr
		495		504		513		522		531		540					
CTG	CTC	CCT	CTG	CTG	GTC	ATC	CTC	CTG	TCT	TAC	GCC	CGG	GTG	TCA	GTG	AAG	CTC
Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Val	Ile	Leu	Leu	Ser	Tyr	Ala	Arg	Val	Ser	Val	Lys	Leu
		549		558		567		576		585		594					
CGC	AAC	CGC	GTG	GTG	CCG	GCG	CGC	GTG	ACC	CAG	AGC	CAG	GCC	GAC	TGG	GAC	CGC
Arg	Asn	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Arg	Val	Thr	Gln	Ser	Gln	Ala	Asp	Trp	Asp	Arg
		603		612		621		630		639		648					
GCT	CGG	CGC	CGG	CGC	ACC	TTC	TGC	TTC	CTG	GTG	GTG	GTC	GTG	GTG	GTG	TTC	ACC
Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Phe	Cys	Leu	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Phe	Thr
		657		666													
CTC	TGC	TGG	CTG	CCC	TTC	TTC	3'										
Leu	Cys	Trp	Leu	Pro	Phe	Phe											

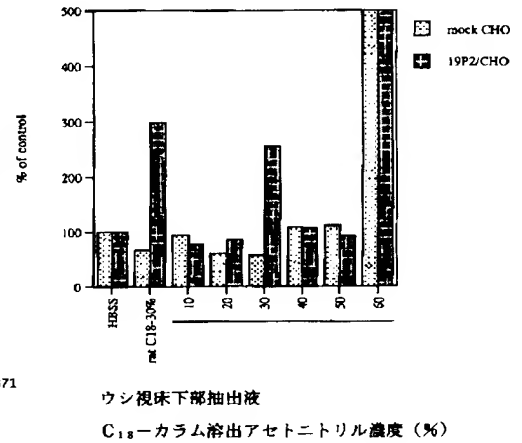
【図9】

1	CATCGTCAAGCAGATGAAGATCATCCACGAGGATGGCTACTCCGAGGGCCAGCAGAAATT	60
1		1
61	CTGCCCCCTTCCTCCCGCGAGTGCTTTCCCGCTCTCCAAACCCCACTCCCAGGTGGCCATG	120
1		1
121	GCCTCATCGACCACTCGGGGCCCCAGGGTTTCTGACTTATTTCTGGGCTGCCGCCGGCG	180
1	AlaSerSerThrThrArgGlyProArgValSerAspLeuPheSerGlyLeuProProAla	21
181	GTCACAACTCCCGCCAACCAGAGCGCAGAGGCCTCGGGGGCAACGGGTGGTGGCTGGC	240
21	ValThrThrProAlaAsnGlnSerAlaGluAlaSerAlaGlyAsnGlySerValAlaGly	41
241	GCGGACGCTCCAGCCGTCACGCCCTTCAGAGCCTGCAGCTGGTGCATCAGCTGAAGGGG	300
41	AlaAspAlaProAlaValThrProPheGlnSerLeuGlnLeuValHisGlnLeuLysGly	61
301	CTGATCGTGCTGCTCTACAGCGTCGTGGTGGTGGTGGGGCTGGTGGGCAACTGCCTGCTG	360
61	LeuIleValLeuLeuTyrSerValValValValValGlyLeuValGlyAsnCysLeuLeu	81
361	GTGCTGGTGTGATCGCGCGGTGCGCCGGCTGCACAACGTGACGAACCTTCCTCATCGGCAAC	420
81	ValLeuValIleAlaArgValArgArgLeuHisAsnValThrAsnPheLeuIleGlyAsn	101
421	CTGGCCTTGTCCGACGTGCTCATGTGCACCGCCTGCGTGGCGCTCACGCTGGCCTATGCC	480
101	LeuAlaLeuSerAspValLeuMetCysThrAlaCysValProLeuThrLeuAlaTyrAla	121
481	TTGAGCCACGCGGCTGGGTGTTCGGCGGCGGCCTGTGCCACCTGGTCTTCTTCCTGCAG	540
121	PheGluProArgGlyTrpValPheGlyGlyGlyLeuCysHisLeuValPhePheLeuGln	141
541	CCGGTCACCGTCTATGTGTGGTGTTCACCGTCAACCACCATCGCAGTGGACCGCTACGTC	600
141	ProValThrValTyrValSerValPheThrLeuThrThrIleAlaValAspArgTyrVal	161
601	GTGCTGGTGCACCCGCTGAGGCGGCGCATCTCGCTGCGCCTCAGCGCCTACGCTGTGCTG	660
161	ValLeuValHisProLeuArgArgArgIleSerLeuArgLeuSerAlaTyrAlaValLeu	181
661	GCCATCTGGGCGCTGTCCGCGGTGCTGGCGCTGCCCGCCCCCGTGCACACCTATCAGTG	720
181	AlaIleTrpAlaLeuSerAlaValLeuAlaProAlaAlaValHisThrTyrHisVal	201
721	GAGCTCAAGCGCACGACGTGCGCCTCTGCGAGGAGTTCTGGGGCTCCAGGAGCGCCAG	780
201	GluLeuLysProHisAspValArgLeuCysGluGluPheTrpGlySerGlnGluArgGln	221
781	CGCCAGCTCTACGCCCTGGGGGTGCTGCTGGTGCACCTACCTGCTCCCTCTGCTGGTCAATC	840
221	ArgGlnLeuTyrAlaTrpGlyLeuLeuLeuValThrTyrLeuLeuProLeuLeuValIle	241
841	CTCCTGTCTTACGTCCGGGTGTCAAGTGAAGCTCCGCAACCGCGTGGTGCCGGGCTGCGTG	900
241	LeuLeuSerTyrValArgValSerValLysLeuArgAsnArgValValProGlyCysVal	261
901	ACCCAGAGCCAGGCCGACTGGGACCGCGCTCGGCGCGGGCGCACCTTCTGCTTGCTGGTG	960
261	ThrGlnSerGlnAlaAspTrpAspArgAlaArgArgArgThrPheCysLeuLeuVal	281
961	GTGCTCGTGGTGGTGTTCGCCGTCTGCTGGCTGCCGCTGCACGTCTTCAACCTGCTGCGG	1020
281	ValValValValValPheAlaValCysTrpLeuProLeuHisValPheAsnLeuLeuArg	301
1021	GACCTCGACCCCCACGCCATCGACCCCTACGCCCTTGGGCTGGTGCAGCTGCTCTGCCAC	1080
301	AspLeuAspProHisAlaIleAspProTyrAlaPheGlyLeuValGlnLeuLeuCysHis	321
1081	TGGCTCGCCATGAGTTCCGCCCTGCTACAACCCCTTCATCTACGCCCTGGCTGCACGACAGC	1140
321	TrpLeuAlaMetSerSerAlaCysTyrAsnProPheIleTyrAlaTrpLeuHisAspSer	341
1141	TTCCGCGAGGAGCTGCGCAAACTGTTGGTTCGCTTGGCCCCGCAAGATAGCCCCCATGCC	1200
341	PheArgGluGluLeuArgLysLeuLeuValAlaTrpProArgLysIleAlaProHisGly	361
1201	CAGAATATGACCGTCAGCGTGGTCACTCTGATGCCACTTAGCCAGGCCTTGGTCAAGGAGC	1260
361	GlnAsnMetThrValSerValValIle***	371
1261	TCCACTTCAACTGGCCTCCTAGGGCCACCTCGAGGTCAATCTGGTGCTTATTCTCAGCA	1320
371		371
1321	CCAGAGCTAGC	1331
371		371

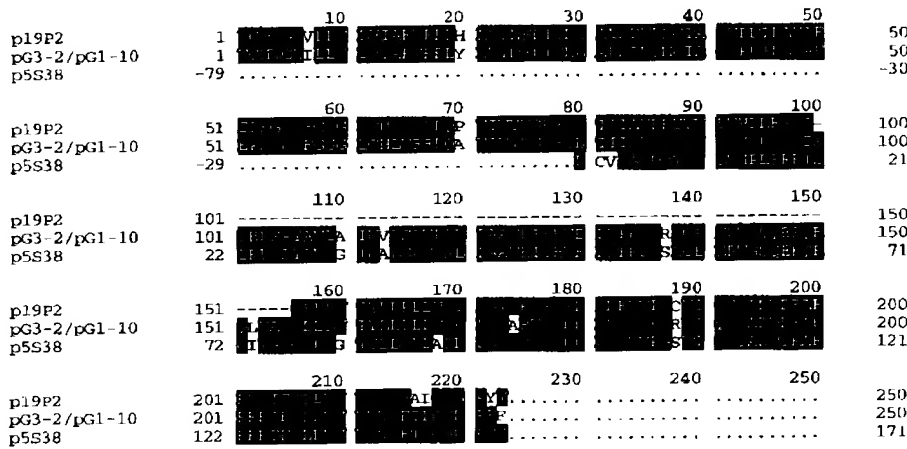
【図11】



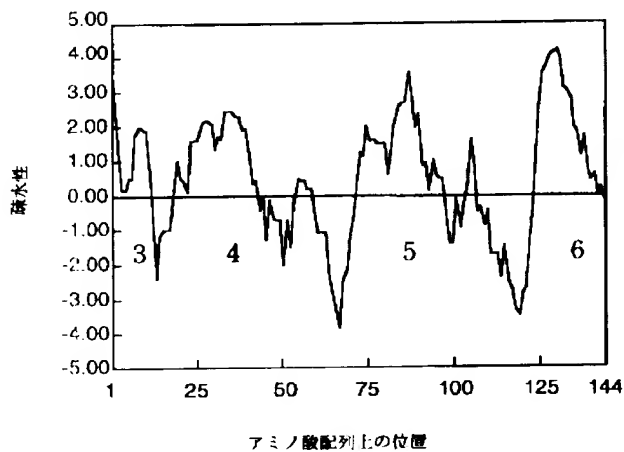
【図17】



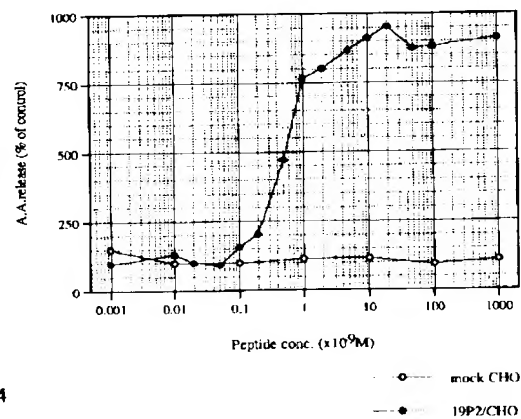
【図13】



【図14】

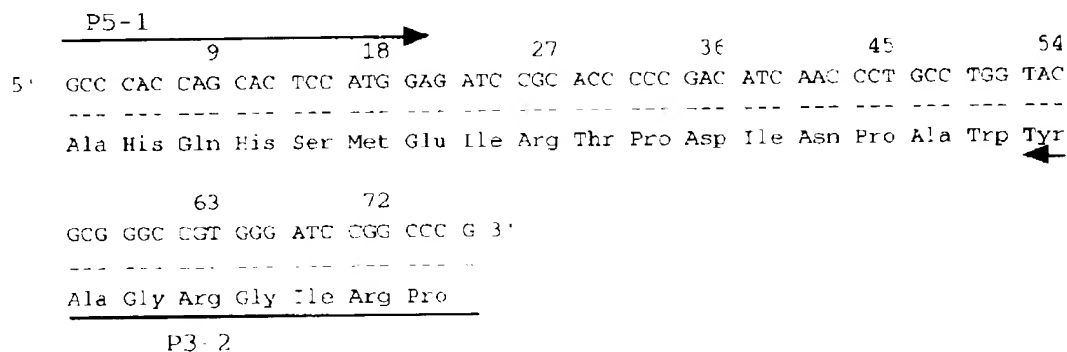


【図25】

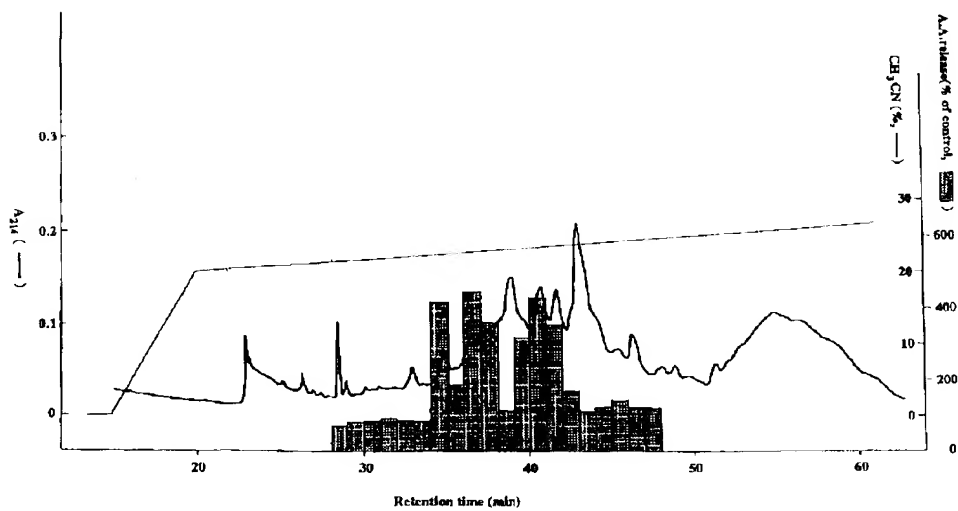


	9				18				27				36				45				54			
5'	CTG	TGT	GTC	ATC	GCG	GTG	GAT	AGG	TAC	GTG	GTT	CTG	GTG	CAC	CCG	CTA	CGT	CGG	---	---	---	---		
	Leu	Cys	Val	Ile	Ala	Val	Asp	Arg	Tyr	Val	Val	Leu	Val	His	Pro	Leu	Arg	Arg	---	---	---	---		
	63				72				81				90				99				108			
	CGC	ATT	TCA	CTG	AGG	CTC	AGC	GCC	TAC	GCG	GTG	CTG	GCC	ATC	TGG	GCT	CTA	TCT	---	---	---	---		
	Arg	Ile	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ala	Val	Leu	Gly	Ile	Trp	Ala	Leu	Ser	---	---	---	---		
	117				126				135				144				153				162			
	GCA	GTG	CTG	GCG	CTG	CCG	GCC	GCG	GTG	CAC	ACC	TAC	CAT	GTG	GAG	CTC	AAG	CCC	---	---	---	---		
	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	His	Thr	Tyr	His	Val	Glu	Leu	Lys	Pro	---	---	---	---		
	171				180				189				198				207				216			
	CAC	GAC	GTG	AGC	CTC	TGC	GAG	GAG	TTC	TGG	GGC	TCG	CAG	GAG	CGC	CAA	CGC	CAG	---	---	---	---		
	His	Asp	Val	Ser	Leu	Cys	Glu	Glu	Phe	Trp	Gly	Ser	Gln	Glu	Arg	Gln	Arg	Gln	---	---	---	---		
	225				234				243				252				261				270			
	ATC	TAC	GCC	TGG	GGG	CTG	CTT	CTG	GGC	ACC	TAT	TTG	CTC	CCC	CTG	CTG	GCC	ATC	---	---	---	---		
	Ile	Tyr	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Tyr	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Ala	Ile	---	---	---	---		
	279				288				297				306				315				324			
	CTC	CTG	TCT	TAC	GTA	CGG	GTG	TCA	GTG	AAG	CTG	AGG	AAC	CGC	GTG	GTG	CCT	GGC	---	---	---	---		
	Leu	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Val	Ser	Val	Lys	Leu	Arg	Asn	Arg	Val	Val	Pro	Gly	---	---	---	---		
	333				342				351				360				369				378			
	AGC	GTG	ACC	CAG	AGT	CAA	GCT	GAC	TGG	GAC	CGA	GCG	CGT	CGC	CGC	CGC	ACT	TTC	---	---	---	---		
	Ser	Val	Thr	Gln	Ser	Gln	Ala	Asp	Trp	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Phe	---	---	---	---		
	387				396				405				414				423				432			
	TGT	CTG	CTG	GTG	GTG	GTG	GTG	GTA	GTG	TTC	ACG	CTC	TGC	TGG	CTG	CCC	TTC	TAC	---	---	---	---		
	Cys	Leu	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Phe	Thr	Leu	Cys	Trp	Leu	Pro	Phe	Tyr	---	---	---	---		

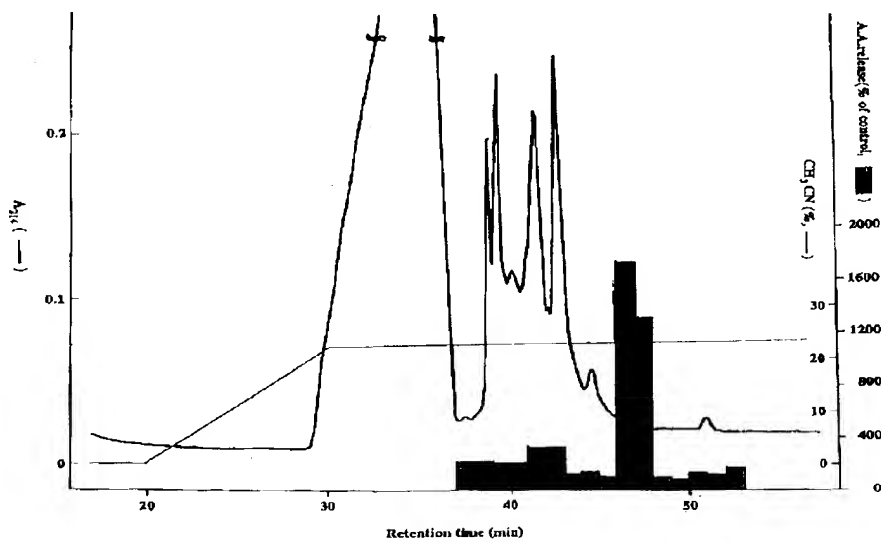
【图 2-2】



【図18】



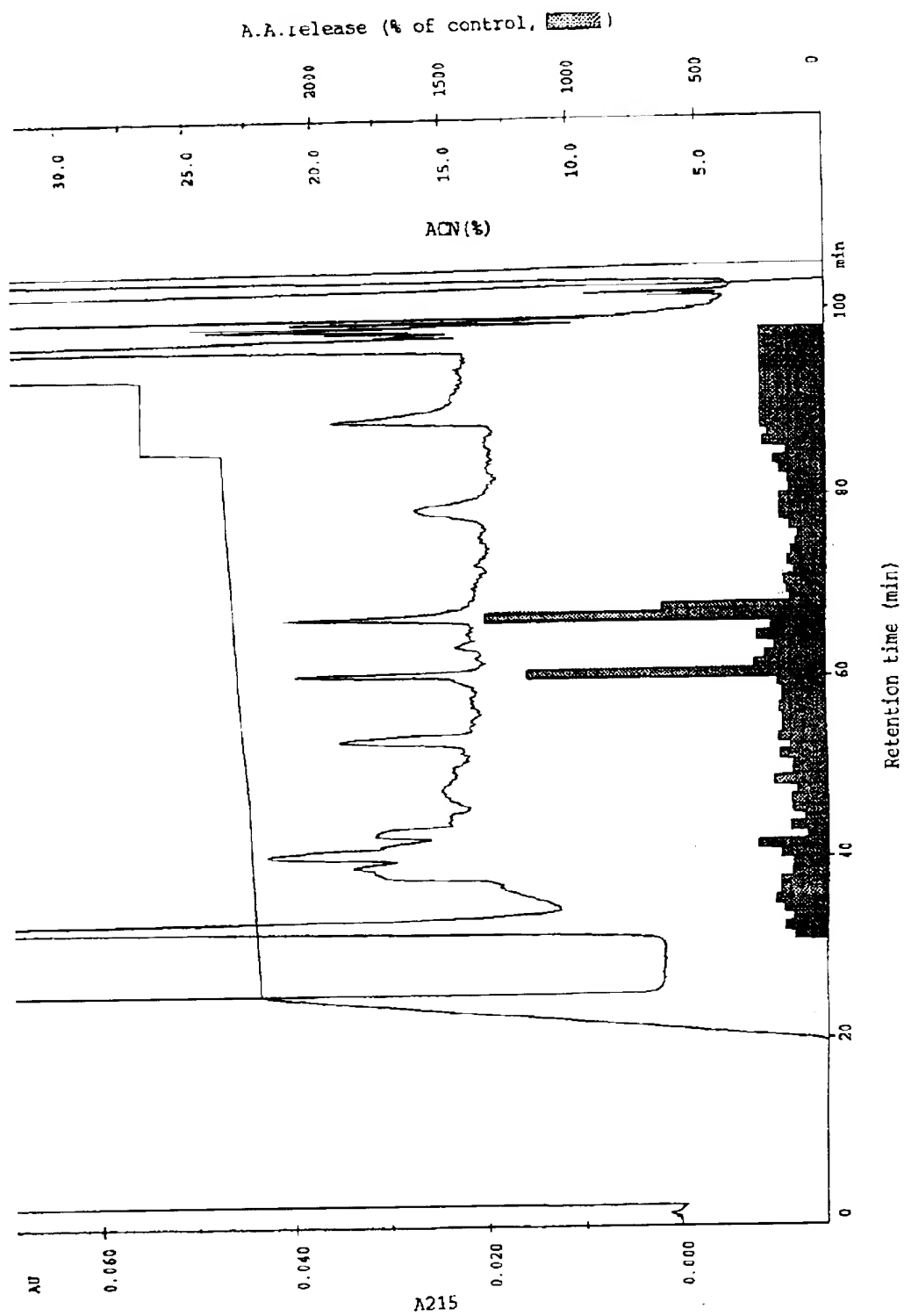
【図19】



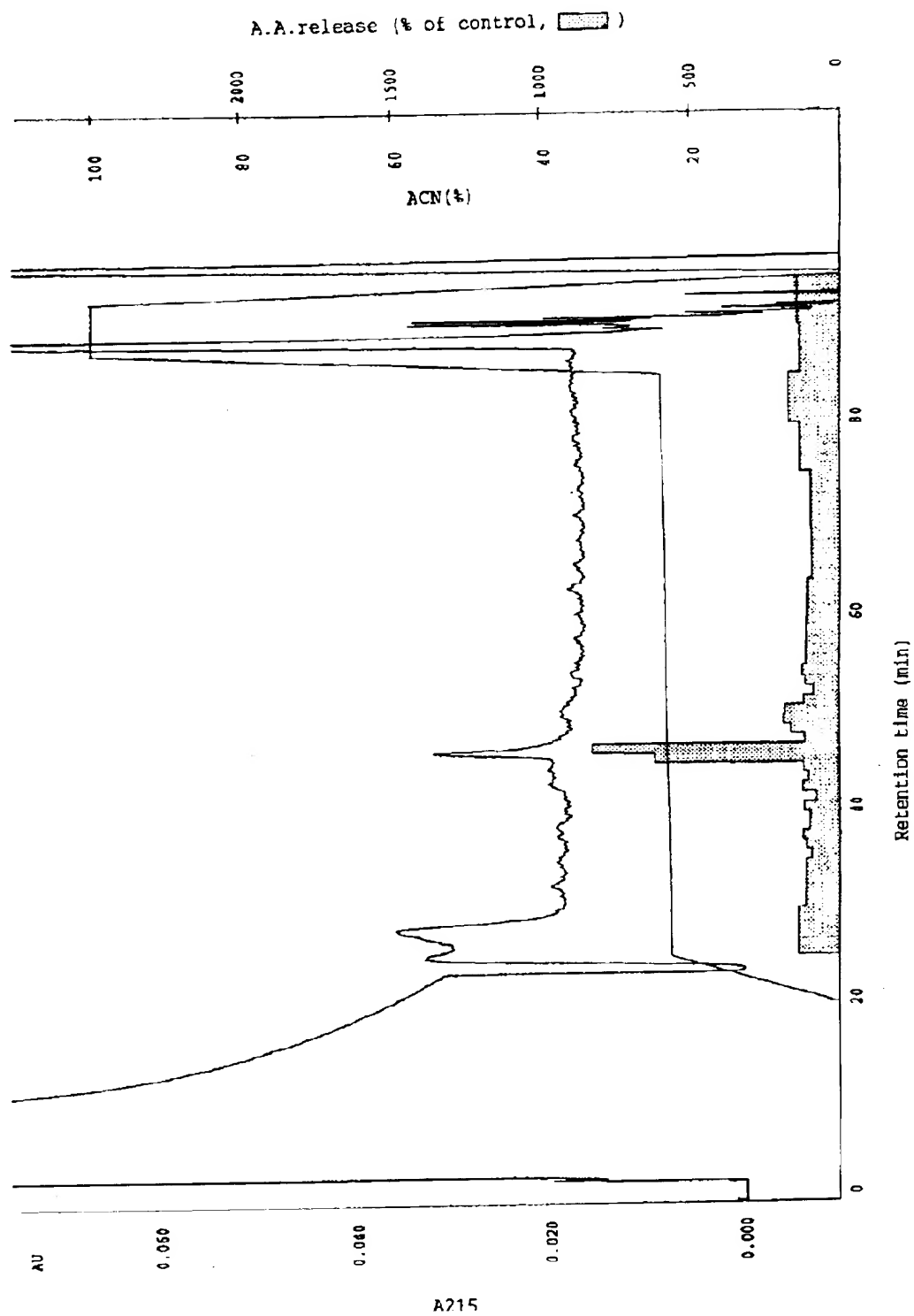
【図23】

1	GTGGAATGAAGGCGGTGGGGCCCTGGCTCCTCTGCCTGCTGCTGGGCCTGGCCCTG	59
1	MetLysAlaValGlyAlaTrpLeuLeuCysLeuLeuLeuGlyLeuAlaLeu	18
60	CAGGGGGCTGCCAGCAGAGCCACCCAGCACTCCATGGAGATCCGCACCCCCGACATCAAC	119
19	GlnGlyAlaAlaSerArgAlaHisGlnHisSerMetGluIleArgThrProAspIleAsn	38
	PDN	
120	CCTGCCT	126
39	<u>ProAla</u>	40

【図20】



【図21】



【図24】

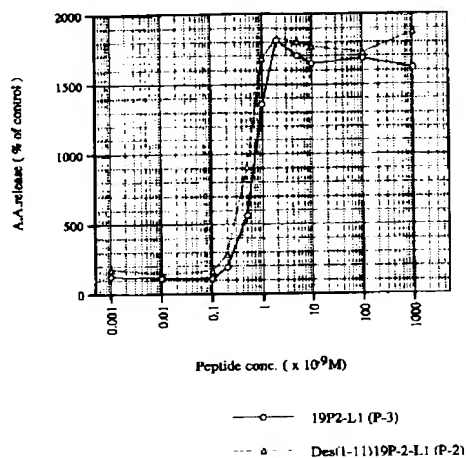
(a)

1	GTGGAATGAAGCGGTGGGGCCCTGGCTCCTCTGCCTGCTGCTGCTGGGCCTGGCCCTG	59
1	MetLysAlaValGlyAlaTrpLeuLeuCysLeuLeuLeuLeuGlyLeuAlaLeu	18
60	CAGGGGGCTGCCAGCAGAGCCCACCAGCACTCCATGGAGATCCGCACCCCCGACATCAAC	119
19	GlnGlyAlaAlaSerArgAlaHisGlnHisSerMetGluIleArgThrProAspIleAsn	38
120	CCTGCCTGGTACGCRGGCCGTGGGATCCGGCCCGTGGGCCTGCTTCGGCCGGCGAAGAGCT	179
39	ProAlaTrpTyrAlaGlyArgGlyIleArgProValGlyArgPheGlyArgArgArgAla	58
180	CCCCCGGGGACGGACCCAGGCCTGGCCCCCGGCGTGTGCCGGCCTGCTTCCGCCTGGAA	239
59	AlaProGlyAspGlyProArgProGlyProArgArgValProAlaCysPheArgLeuGlu	78
240	GGCGGYGCTGAGCCCTCCCGAGCCCTCCCGGGGCGGCTGACGGCCCAGCTGGTCCAGGAA	299
79	GlyGlyAlaGluProSerArgAlaLeuProGlyArgLeuThrAlaGlnLeuValGlnGlu	98
300	TAACAGCGGGAGCCTGCCCCCACCCTCCTCCTCCACCAGCCACCTTCCCTCCAGTCCT	359
98		98
360	AATAAAAGCAGCTGGCTTGTT	380
98		98

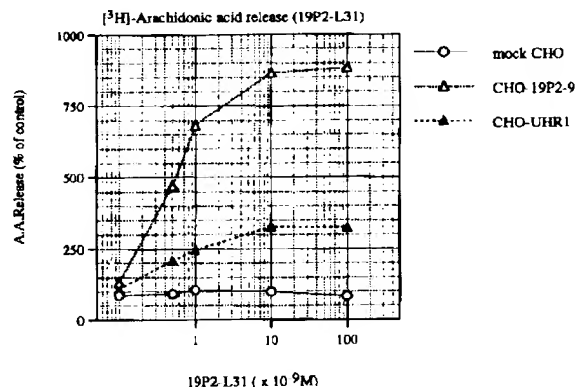
(b)

1	GTGGAATGAAGCGGTGGGGCCCTGGCTCCTCTGCCTGCTGCTGCTGGGCCTGGCCCTG	59
1	MetLysAlaValGlyAlaTrpLeuLeuCysLeuLeuLeuLeuGlyLeuAlaLeu	18
60	CAGGGGGCTGCCAGCAGAGCCCACCAGCACTCCATGGAGATCCGCACCCCCGACATCAAC	119
19	GlnGlyAlaAlaSerArgAlaHisGlnHisSerMetGluIleArgThrProAspIleAsn	38
120	CCTGCCTGGTACGCRGGCCGTGGGATCCGGCCCGTGGGCCTGCTTCGGCCGGCGAAGAGCT	179
39	ProAlaTrpTyrAlaGlyArgGlyIleArgProValGlyArgPheGlyArgArgArgAla	58
180	GCCCTGGGGGACGGACCCAGGCCTGGCCCCCGGCGTGTGCCGGCCTGCTTCCGCCTGGAA	239
59	AlaLeuGlyAspGlyProArgProGlyProArgArgValProAlaCysPheArgLeuGlu	78
240	GGCGGYGCTGAGCCCTCCCGAGCCCTCCCGGGGCGGCTGACGGCCCAGCTGGTCCAGGAA	299
79	GlyGlyAlaGluProSerArgAlaLeuProGlyArgLeuThrAlaGlnLeuValGlnGlu	98
300	TAACAGCGGGAGCCTGCCCCCACCCTCCTCCTCCACCAGCCACCTTCCCTCCAGTCCT	359
98		98
360	AATAAAAGCAGCTGGCTTGTT	380
98		98

【図27】



【図37】



【図29】

10	20	30	40	50	60
ATGAAGGCGG	TGGGGGCGTG	GCTCCTCTGC	CTGCTGCTGC	TGGGCCTGGC	CCTGCAGGGG
70	80	90	100	110	120
GCTGCCAGCA	GAGCCCACTA	GCACTCCATG	GAGATCCGCA	GTGAGTGCTT	AGCCCCCCCC
130	140	150	160	170	180
CTGCCCCCAG	GGGTACAGAG	GGGGGCGTGG	CCACTTCCTG	GGCTGGGACA	TCCTTGCTAA
190	200	210	220	230	240
GCATCCTGGG	GTGTTGGGTTT	GGCCTCCTGT	TCCCCAGACC	CTTCCCCCAG	GTGGCCCGGA
250	260	270	280	290	300
CAGGTGCTCC	CAAGGGTCCC	GGCCCAGCAC	ACGGGGGAGG	GTCACCTCTC	ACCACACGGG
310	320	330	340	350	360
TGGCCTGGGG	CTGAGTGAC	GTCACCCATG	AGAACGGGGC	TGTGAGGACA	GGAAAGGAAG
370	380	390	400	410	420
GGGAGTGTTT	CCTGGTGTGA	GTCTGAAATC	CTACTTCCCA	AAGCCACCCC	AGCACCAGAA
430	440	450	460	470	480
ATGGGGCGCTC	CGGGTGAACC	TCCTGTGCGG	GTGGGTGGTC	CTGGCATGGC	CTGGGCGACA
490	500	510	520	530	540
GGCAGCCATG	AGCTGAGCAC	ACACCCGGCC	CGGCCACCAG	GGCTGTATGC	TCCAGGGCAC
550	560	570	580	590	600
AGGCCTCCAT	GCGCTCTTCT	CTCTCTTTTC	AGCCCCCGAC	ATCAACCCCTG	CCTGGTACGC
610	620	630	640	650	660
AGGCCGTGGG	ATCCGGCCCCG	TGGGCCGCTT	CGGCCGGCGA	AGAGCTGCCC	TGGGGGACGG
670	680	690	700	710	720
ACCCAGGCCT	GGCCCCCGGC	GTGTGCCCGC	CTGCTTCCGC	CTGGAAGGCG	GTGCTGAGCC
730	740	750	760	770	780
CTCCCGAGCC	CTCCCGGGGC	GGCTGACCGC	CCAGCTGGTC	CAGGAATAA

【図30】

genome cDNA		10	20	30	40	50	
	1	ATGAAGGCGG	TGGGGCCCTG	GCTCCTCTGC	CTGCTGCTGC	TGGGCCCTGGC	50
	1	ATGAAGGCGG	TGGGGCCCTG	GCTCCTCTGC	CTGCTGCTGC	TGGGCCCTGGC	50
genome cDNA		60	70	80	90	100	
	51	CCTGCAGGGG	GCTGCCAGCA	GAGCCACCA	GCACTCCATG	GAGATCCGCA	100
	51	CCTGCAGGGG	GCTGCCAGCA	GAGCCACCA	GCACTCCATG	GAGATCCGCA	100
genome cDNA		110	120	130	140	150	
	101	GTGAGTGTCT	AGCCCCGCCC	CTGCCCCCAG	GGGTCAACAG	GGGGGCCCTGG	150
	101	-----	-----	-----	-----	-----	150
genome cDNA		160	170	180	190	200	
	151	CCACTTCCTG	GGCTGGGACA	TCCTTGCTAA	GCATCCTGGG	GTGCGGGTTT	200
	151	-----	-----	-----	-----	-----	200
genome cDNA		210	220	230	240	250	
	201	GGCTCCTGT	TCCCCAGACC	CTTCCCCCAG	GTGGCCCGGA	CAGGTGCTCC	250
	201	-----	-----	-----	-----	-----	250
genome cDNA		260	270	280	290	300	
	251	CAAGGGTCCC	GGCCAGCAC	ACGGGGGAGG	GTCACCTCTC	ACCACACGGG	300
	251	-----	-----	-----	-----	-----	300
genome cDNA		310	320	330	340	350	
	301	TGGCCTGGGG	CTGAGTGCAC	GTCACCCATG	AGAACGGGGC	TGTGAGGACA	350
	301	-----	-----	-----	-----	-----	350
genome cDNA		360	370	380	390	400	
	351	GGAAAGGAAG	GGGAGTGTGT	CCTGGTGTGA	GTCTGAAATC	CTACTTCCCA	400
	351	-----	-----	-----	-----	-----	400
genome cDNA		410	420	430	440	450	
	401	AAGCCACCCC	AGCACCAGAA	ATGGGCGCTC	CGGGTGAACC	TCCTGTGCGG	450
	401	-----	-----	-----	-----	-----	450
genome cDNA		460	470	480	490	500	
	451	GTGGGTGGTC	CTGGCATGGC	CTGGGCGACA	GGCAGCCATG	AGCTGAGCAC	500
	451	-----	-----	-----	-----	-----	500
genome cDNA		510	520	530	540	550	
	501	ACACCCGGCC	CGGCCACCCAG	GGCTGTATGC	TCCAGGGCAC	AGGCCTCCAT	550
	501	-----	-----	-----	-----	-----	550
genome cDNA		560	570	580	590	600	
	551	GCGCTCTTCT	CTCTCTTTCC	AGCCCCCGAC	ATCAACCCCTG	CCTGGTACGC	600
	551	-----	-----	-----	-----	-----	600
genome cDNA		610	620	630	640	650	
	601	AGGCCGTGGG	ATCCGGCCCG	TGGGCCGCTT	CGGCCGGCGA	AGAGCTGCCC	650
	601	GGGCCGTGGG	ATCCGGCCCG	TGGGCCGCTT	CGGCCGGCGA	AGAGCTGCCC	650
genome cDNA		660	670	680	690	700	
	651	TGGGGACCG	ACCCAGGCCT	GGCCCCCGGC	GTGTGCCGGC	CTGCTTCCGC	700
	651	CGGGGACCG	ACCCAGGCCT	GGCCCCCGGC	GTGTGCCGGC	CTGCTTCCGC	700
genome cDNA		710	720	730	740	750	
	701	CTGGAAGGCG	GTGCTGAGCC	CTCCCGAGCC	CTCCCGGGGC	GGCTGACGGC	750
	701	CTGGAAGGCG	GTGCTGAGCC	CTCCCGAGCC	CTCCCGGGGC	GGCTGACGGC	750
genome cDNA		760	770	780	790	800	
	751	CCAGCTGGTC	CAGGAATAA.	800
	751	CCAGCTGGTC	CAGGAATAA.	800

【図31】

5'	ATG	AAG	GCG	GTG	GGG	GCC	TGG	CTC	CTC	TGC	CTG	CTG	CTG	GGC	CTG	GCC	CTG
	M	K	A	V	G	A	W	L	L	C	L	L	L	G	L	A	L
	CAG	GGG	GCT	GCC	AGC	AGA	GCC	CAC	CAG	CAC	TCC	ATG	GAG	ATC	CGC	ACC	CCC
	Q	G	A	A	S	R	A	H	Q	H	S	M	E	I	R	T	P
	ATC	AAC	CCT	GCC	TGG	TAC	GCA	GGC	CGT	GGG	ATC	CGG	CCC	GTG	GGC	CGC	TTC
	I	N	P	A	W	Y	A	G	R	G	I	R	P	V	G	R	F
	CGG	CGA	AGA	GCT	GCC	CTG	GGG	GAC	GGA	CCC	AGG	CCT	GGC	CCC	CGG	CGT	GTG
	R	R	R	A	A	L	G	D	G	P	R	P	G	P	R	R	V
	GCC	TGC	TTC	CGC	CTG	GAA	GGC	GGT	GCT	GAG	CCC	TCC	CGA	GCC	CTC	CCG	GGG
	A	C	F	R	L	E	G	G	A	E	P	S	R	A	L	P	G
	CTG	ACG	GCC	CAG	CTG	GTC	CAG	GAA	TAA	3'							
	L	T	A	Q	L	V	Q	E	*								

【図32】

1	GGCATCATCCAGGAAGACGCGAGCATGGCCCTGAAGACGTGGCTTCTGTGCTTGCTGCTG	59
1	MetAlaLeuLysThrTrpLeuLeuCysLeuLeuLeu	12
60	CTAAGCTTGGTCCTCCAGGGGCTTCCAGCCGAGCCCACCAGCACTCCATGGAGACAAGA	119
13	LeuSerLeuValLeuProGlyAlaSerSerArgAlaHisGlnHisSerMetGluThrArg	32
120	ACCCCTGATATCAATCCTGCCTGGTACACGGGCCGCGGGATCAGGCCTGTGGGCCGCTTC	179
33	ThrProAspIleAsnProAlaTrpTyrThrGlyArgGlyIleArgProValGlyArgPhe	52
180	GGCAGGAGAAGGGCAACCCCGAGGGATGTCACTGGACTTGGCCAACTCAGCTGCCTCCCCA	239
53	GlyArgArgArgAlaThrProArgAspValThrGlyLeuGlyGlnLeuSerCysLeuPro	72
240	CTGGATGGACGCACCAAGTTCTCTCAGCGTGGATAACACCCCGAGCTCGAGAAGACAGTGC	299
73	LeuAspGlyArgThrLysPheSerGlnArgGly***	83
300	TGCTGAGCCCAAGCCACACTCCCTGTCCCTGCAGACCCCTCCTCTACCCTCCCTCTCCT	359
83		83
360	CTGCT	364
83		83

【図33】

bovine.aa						M	K	A	V	G	A	W	L	L				
			10		20			30			40			50				
bovine.seq	-18	GT	GGAATGAAGG	CGGTGGGGGC	CTGGCTCCTC								32			
rat.seq	1	GGCATCATCC	AGGAAGACGG	AGCATG---	G	CCCTGAAGAC	GTGGCTTCTG								50			
bovine.aa		C	L	L	L	L	G	L	A	L	Q	G	A	A	S	R	A	H
			60		70			80			90				100			
bovine.seq	33	TGCTTGCTGC	TGCTGGGCCT	GGCCCTGCAG	GGGGCTGCCA	GCAGAGCCCA												82
rat.seq	51	TGCTTGCTGC	TGCTAAGCTT	GGTCTCTCCA	GGGGCTGCCA	GCCGAGCCCA												100
				R1														
bovine.aa		Q	H	S	M	E	I	R	T	P	D	I	N	P	A	W	Y	A
			110		120			130			140				150			
bovine.seq	83	CCAGCACTCC	ATGGAGATCC	GCACCCCGCA	CATCAACCCT	GCCTGGTACG												132
rat.seq	101	CCAGCACTCC	ATGGAGACAA	GAACCCCTGA	TATCAATCCT	GCCTGGTACA												150
						R3												
bovine.aa		G	R	G	I	R	P	V	G	R	F	G	R	R	R	A	A	
			160		170			180			190				200			
bovine.seq	133	CGGGCCGTGG	GATCCGGCCC	GTGGCCCGCT	TCGGCCGGCG	AAGAGCTGCC												182
rat.seq	151	CGGGCCGGCG	GATCAGGCCT	GTGGCCCGCT	TCGGCAGGAG	AAGGGCAACC												200
				R4														
bovine.aa		P	G	D	G	P	R	P	G	P	R	R	V	P	A	C	F	R
			210		220			230			240				250			
bovine.seq	183	CCGGGGGACG	GACCCAGGCC	TGGCCCCCGG	CGTGTGCCCG	CCTGCTTCCG												232
rat.seq	201	CCGAGGGATG	TCACTGGACT	TGGC-----	---CAACTCA	GCTGCTTCCC												250
bovine.aa		L	E	G	G	A	E	P	S	R	A	L	P	G	R	L	T	A
			260		270			280			290				300			
bovine.seq	233	CCTGGAAGGC	GGCCTGAGC	CCTCCCGAGC	CCTCCCGGGG	CGGCTGACGG												282
rat.seq	251	ACTGGATGGA	CGCACCAAGT	TCTCTCAGCG	TGGATAACAC	CCCAGCTCGA												300
bovine.aa		Q	L	V	Q	E	*											
			310		320			330			340				350			
bovine.seq	283	CCCAGCTGGT	CCAGGAATAA	CAGCGGGAGC	CTGCCCCCCA	CCCCTCTCTC												332
rat.seq	301	GAAGACAGTG	CTGCTGAGCC	CAAGCCCACA	CTCCCTGTCC	CCTGCAGACC												350
bovine.aa																		
			360		370			380			390				400			
bovine.seq	333	TCCACCAGCC	ACCTTCCCTC	CAGTCCCTAAT	AAAAGCAGCT	GGCTTGTT..												382
rat.seq	351	CTCTCTTACC	CTCCCTCTCC	TCTGCT....												400

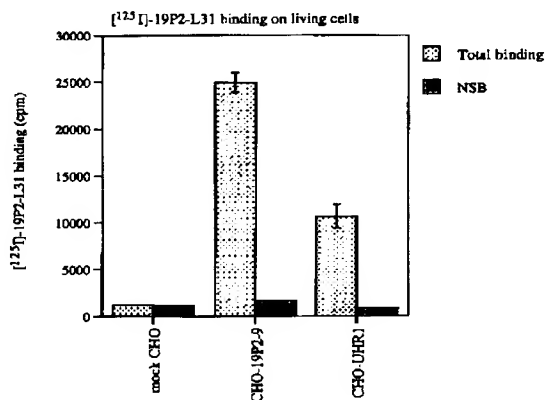
【図35】

		10		20		30		40		50				
bovine.aa	1	MKAVGAWLLC	LLLLGLALQG	AASRAHQHSM	EIRTPDINPA	WYAGRGIRPV								50
rat.aa	1	M-ALKTWLLC	LLLLSLVLPQ	ASSRAHQHSM	ETRTPDINPA	WYTGRGIRPV								50
human.aa	1	MKVLRAWLLC	LLMLGLAIRG	AASRTHRHSM	EIRTPDINPA	WYASRGIRPV								50
		60		70		80		90		100				
bovine.aa	51	GRFGRRRAAP	GDGPRPGPRR	VPACFRLEGG	AEPsRALPGR	LTAQLVQE*								100
rat.aa	51	GRFGRRRATP	RDVTGLG---	QLSCLPLDGR	TKFSQRG*..								100
human.aa	51	GRFGRRRATL	GDVPPKPLRP	RLTCFPLEGG	AMSSQDG*..								100

【図34】

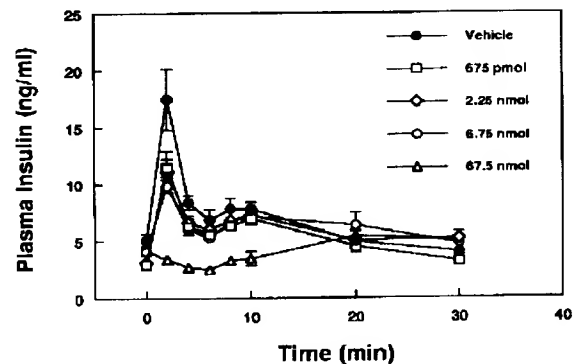
1	GGCCTCCTCGGAGGAGCCAAGGGATGAAGGTGCTGAGGGCCTGGCTCCTGTGCCTGCTG	59
1	MetLysValLeuArgAlaTrpLeuLeuCysLeuLeu	12
60	ATGCTGGGCTTGGCCCTGCGGGGAGCTGCAAGTCGTACCCATCGGCACTCCATGGAGATC	119
13	MetLeuGlyLeuAlaLeuArgGlyAlaAlaSerArgThrHisArgHisSerMetGluIle	32
120	CGCACCCCTGACATCAATCCTGCCTGGTACGCCAGTCGCGGGATCAGGCCTGTGGGCGGC	179
33	ArgThrProAspIleAsnProAlaTrpTyrAlaSerArgGlyIleArgProValGlyArg	52
180	TTCGGTCGGAGGAGGGCAACCCCTGGGGGACGTCCTCCCAAGCCTGGCCTGCGACCCCGGCTG	239
53	PheGlyArgArgArgAlaThrLeuGlyAspValProLysProGlyLeuArgProArgLeu	72
240	ACCTGCTTCCCCCTGGAAGGCGGTGCTATGTCGTCCCAGGATGGCTGACAGCCAGCTTGT	299
73	ThrCysPheProLeuGluGlyGlyAlaMetSerSerGlnAspGly***	87
300	CAAGAACTCACTCTGGAGCCTCCCCACCCACCCCTCTCCTCTCCTTCGGGCTCCTTTC	359
87		87
360	CC	361
87		87

【図36】

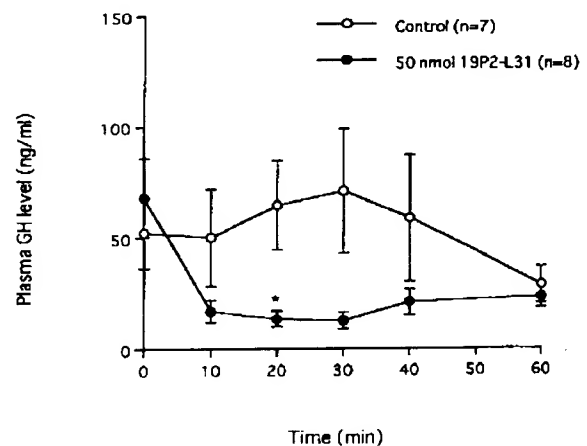


cells: 0.5×10^7 cells/ml
 $[^{125}\text{I}]\text{-19P2-L31}$: 200pM (avg 63857.3cpm)
 NSB: 200nM ($\times 1,000$)
 reaction: RT, 2.5hr
 in HBSS + 0.05% BSA + 0.05% CHAPS
 in 100 μl

【図40】

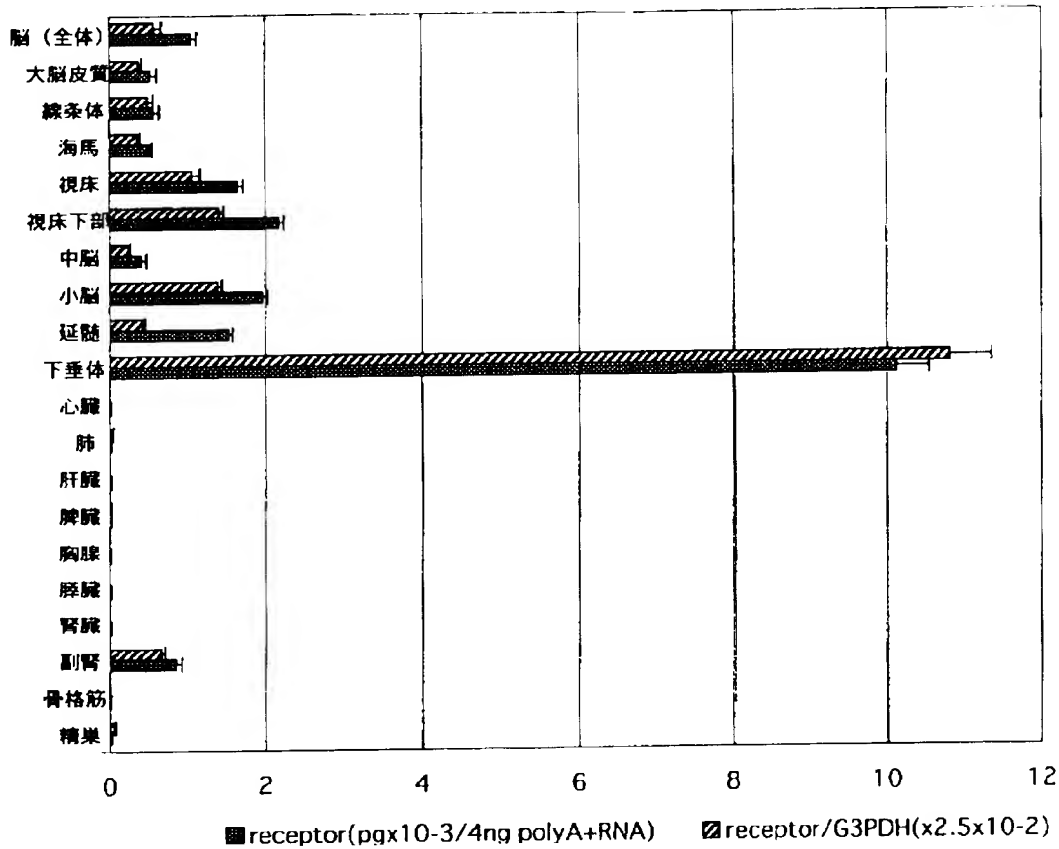


【図48】

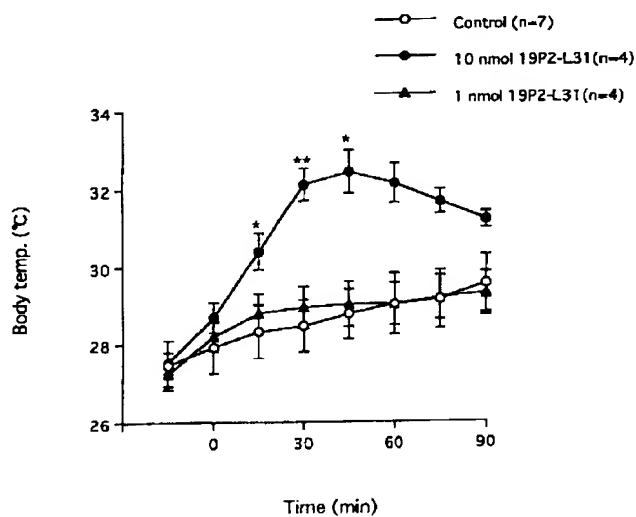


【図38】

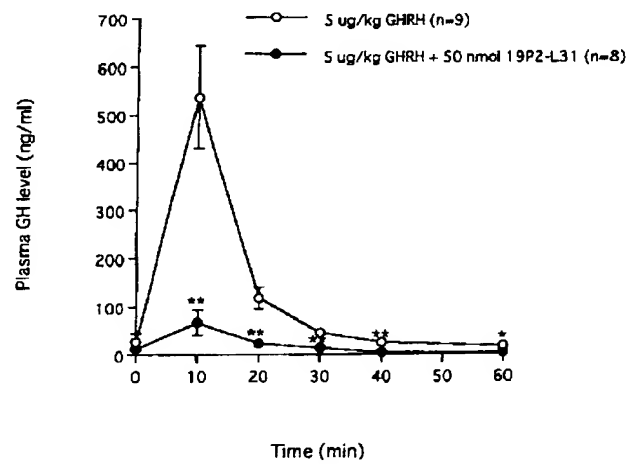
UHR-1(receptor)



【図45】

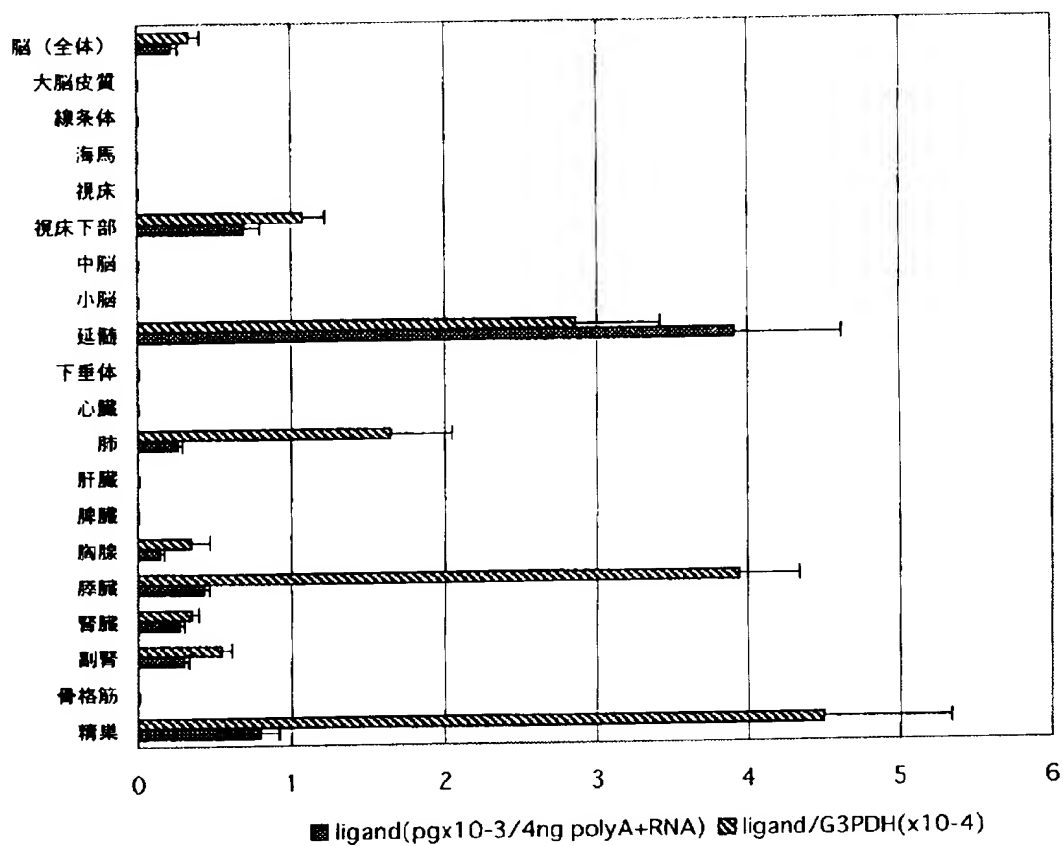


【図49】

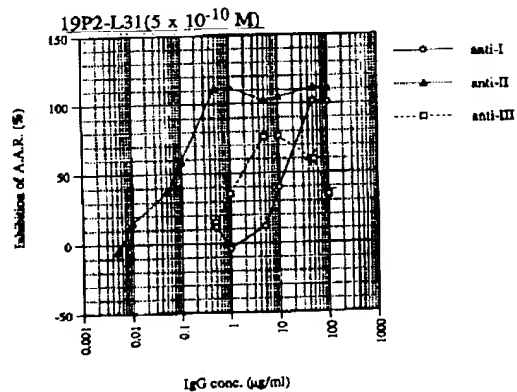


【図39】

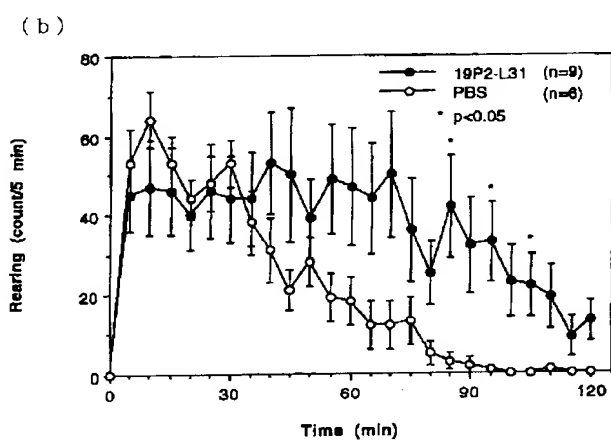
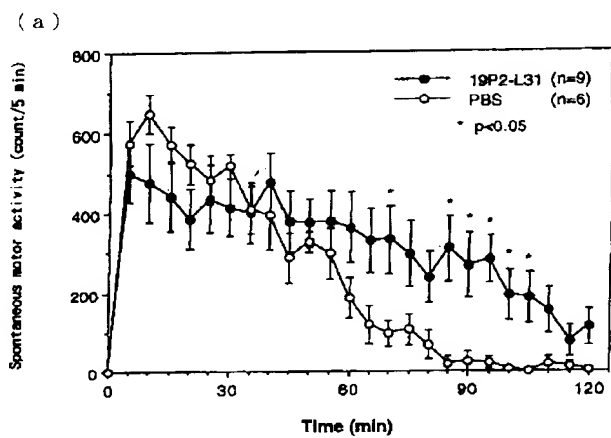
Ligand Polypeptide



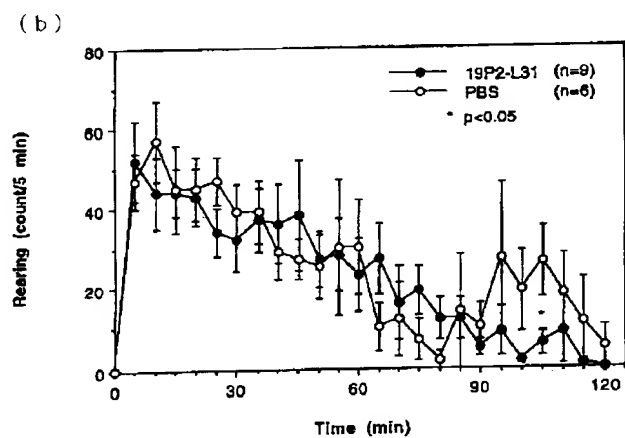
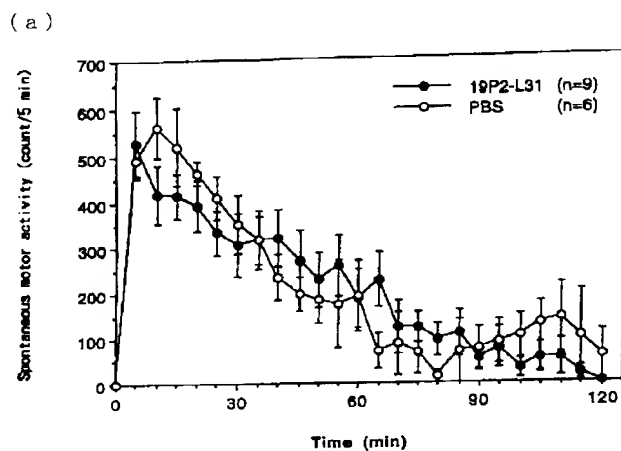
【図51】



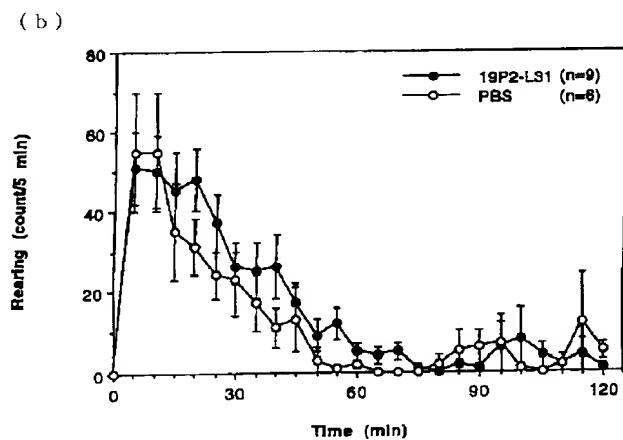
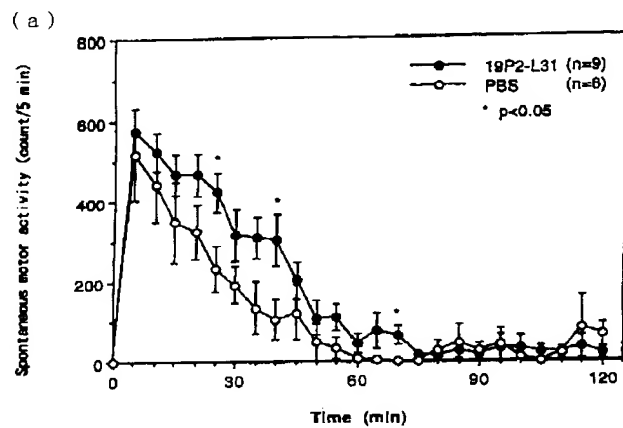
【図41】



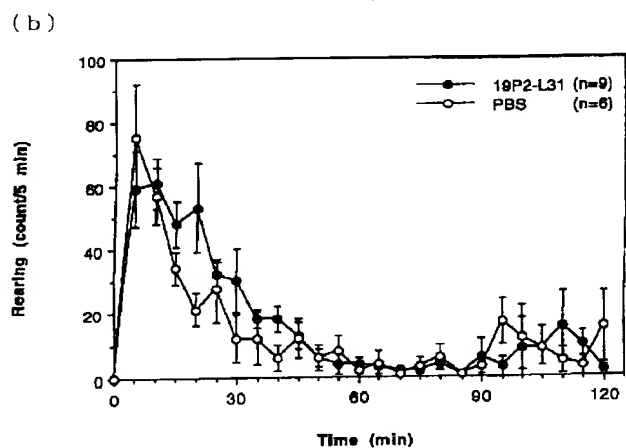
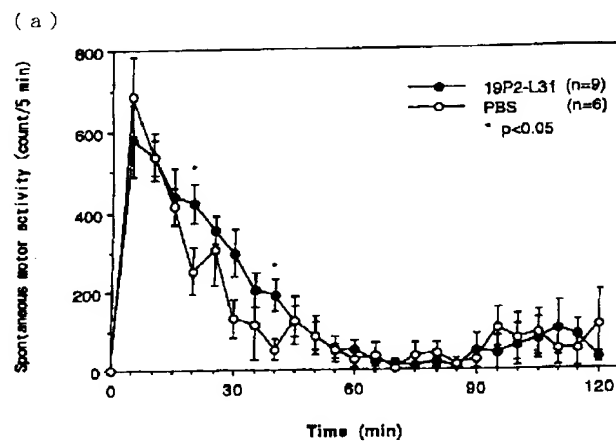
【図42】



【図43】

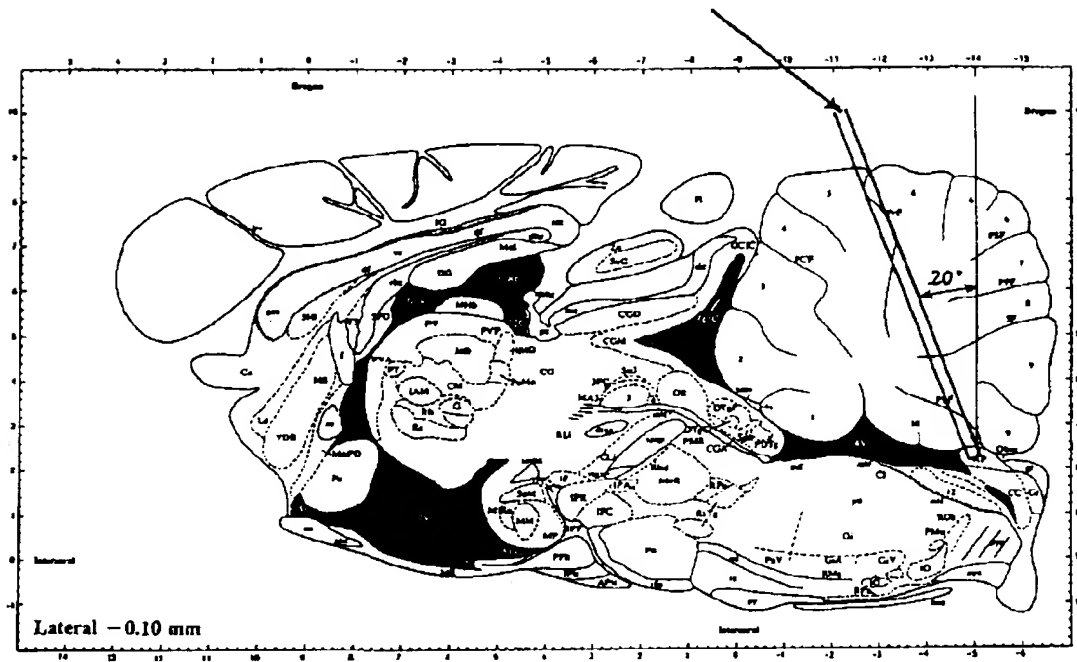


【図44】

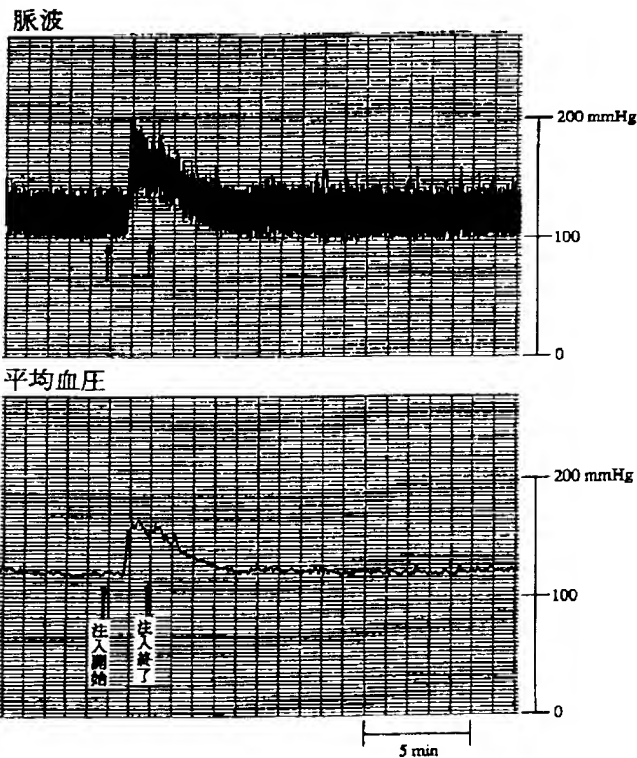


【図46】

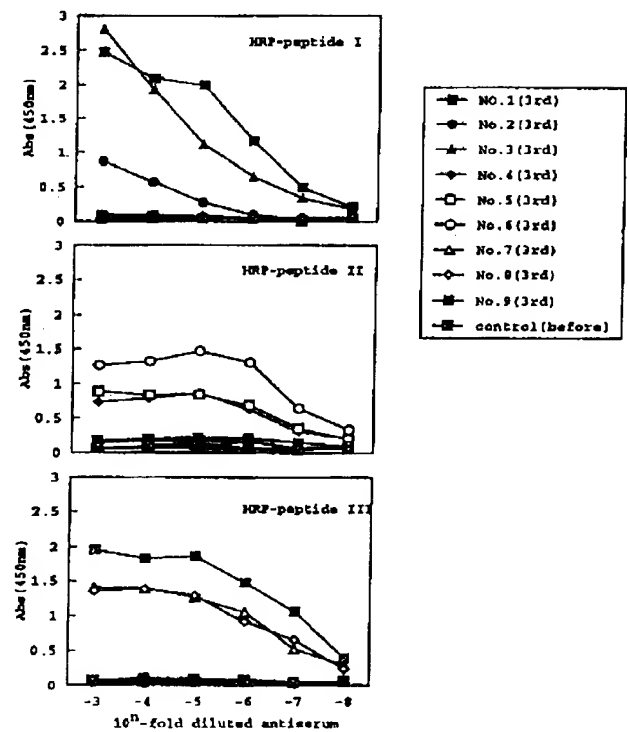
マイクロインジェクションカニューレ



【図47】



【図50】



【図52】

5'	ATG	ACC	TCA	CTG	CCC	OCT	GGA	ACC	ACT	GGG	GAC	CCC	GAT	TTG	TTT	TCT	GGG	54
	Met	Thr	Ser	Leu	Pro	Pro	Gly	Thr	Thr	Gly	Asp	Pro	Asp	Leu	Phe	Ser	Gly	Pro
	TOG	CCA	GCC	GCC	TCC	ACT	CCA	GCC	AAC	CAG	AGT	CCA	GAG	GCT	TCA	CAG	AGC	108
	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Thr	Pro	Ala	Asn	Gln	Ser	Ala	Glu	Ala	Ser	Glu	Ser	Asn
	GTG	TCT	GGG	ACG	GTT	CCC	AGA	GCT	GCA	GCA	GTC	ACG	CCG	TTC	CAG	AGC	CTG	162
	Val	Ser	Ala	Thr	Val	Pro	Arg	Ala	Ala	Ala	Val	Thr	Pro	Phe	Gln	Ser	Leu	Gln
	CTA	GTG	CAC	CAG	CTG	ANG	GGA	CTG	ATC	GTG	ATG	CTG	TAC	AGC	ATC	GTG	GTG	216
	Leu	Val	His	Gln	Leu	Lys	Gly	Leu	Ile	Val	Met	Leu	Tyr	Ser	Ile	Val	Val	Val
	GTG	GGT	CTG	GTG	GCC	AAC	TGC	CTT	CYT	GTG	CTG	ATC	GCG	CCG	GTG	CCG	CCG	270
	Val	Gly	Leu	Val	Gly	Asn	Cys	Leu	Leu	Val	Leu	Val	Ile	Ala	Arg	Val	Arg	Arg
	CTG	CAC	AAC	GTG	ACC	AAC	TTC	CTC	ATC	GCC	AAC	CTG	GCC	TTG	TCC	GAT	GTG	324
	Leu	His	Asn	Val	Thr	Asn	Phe	Leu	Ile	Gly	Asn	Leu	Ala	Leu	Ser	Asp	Val	Leu
	ATG	TGT	GCC	GCC	TGT	GTG	CCT	CTC	ACG	CTG	GCC	TAC	GCC	TCT	GAA	CCT	GCT	378
	Met	Cys	Ala	Ala	Cys	Val	Pro	Leu	Thr	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Glu	Pro	Arg	Gly
	TOG	GTG	TTC	GGT	GGA	GCC	CTG	TCC	CAC	CTT	GTT	TTC	TTC	CTG	CAG	CCG	GTG	432
	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Leu	Cys	His	Leu	Val	Phe	Phe	Leu	Gln	Pro	Val	Thr
	CTC	TAC	GTA	TOG	GTG	TTC	ACA	CTC	ACC	ACA	ATC	GCT	GTG	GAC	CCG	TAT	GTG	486
	Val	Tyr	Val	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Thr	Thr	Ile	Ala	Val	Asp	Arg	Tyr	Val	Val
	CTG	GTG	CAC	CCG	CTA	GGT	CCG	CCG	ATT	TCA	CTG	AAG	CTC	AGC	GCC	TAC	GCT	540
	Leu	Val	His	Pro	Leu	Arg	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ala	Tyr	Ala	Val
	CTG	GCC	ATC	TOG	GCT	CTA	TCT	GCA	GTG	CTG	GCG	CTG	CCG	GCC	GGG	GTG	CAC	594
	Leu	Gly	Ile	Trp	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Pro	Ala	Ala	Val	His	Thr
	TAC	CAT	GTA	GAG	CTC	ANG	CCC	CAC	GAC	GTG	CCG	CTC	TCC	GAG	GAG	TTC	TOG	648
	Tyr	His	Val	Glu	Leu	Lys	Pro	His	Asp	Val	Arg	Leu	Cys	Glu	Glu	Phe	Trp	Gly
	TOG	CAG	GAG	GCC	CAG	GGA	CAG	ATC	TAT	GCC	TGG	GCG	CTG	CTG	CTG	GCC	ACC	702
	Ser	Gln	Glu	Arg	Gln	Arg	Gln	Ile	Tyr	Ala	Trp	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Tyr
	TTG	CTC	CCC	CTG	CTG	GCC	ATT	CTC	CTG	TCT	TAC	GTG	CCG	GTG	TOG	GTG	AAG	756
	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Ala	Ile	Leu	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Val	Ser	Val	Lys	Leu
	CCG	AAC	GCC	GTG	GTG	CCT	GCC	AGC	GTG	ACC	CAG	AGC	CAG	GCT	GAC	TGG	GAC	810
	Arg	Asn	Arg	Val	Val	Pro	Gly	Ser	Val	Thr	Gln	Ser	Gln	Ala	Asp	Trp	Asp	Arg
	GCG	GCT	CCC	GCT	CCC	ACT	TTC	TGC	CTG	CTG	GTG	GTG	GTG	GTG	GTG	GTG	TTC	864
	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Thr	Phe	Cys	Leu	Leu	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Phe	Ala
	GTG	TCC	TOG	CTG	CCT	CTG	CAC	ATT	TTC	AAC	CTG	CTG	CCG	GAC	CTG	GAC	CCG	918
	Val	Cys	Trp	Leu	Pro	Leu	His	Ile	Phe	Asn	Leu	Leu	Arg	Asp	Leu	Asp	Pro	Arg
	GCC	ATC	GAC	CCC	TAC	GCC	TTC	GCC	CTG	GTC	CAG	CTC	CTC	TCC	CAC	TGG	CTT	972
	Ala	Ile	Asp	Pro	Tyr	Ala	Phe	Gly	Leu	Val	Gln	Leu	Leu	Cys	His	Trp	Leu	Ala
	ATG	ACC	TOC	GCC	TAC	AAC	CCC	TTC	ATC	TAT	GCG	TGG	CTG	CAC	CAC	AGC	TTC	1026
	Met	Ser	Ser	Ala	Cys	Tyr	Asn	Pro	Phe	Ile	Tyr	Ala	Trp	Leu	His	Asp	Ser	Phe
	CGA	GAG	GAG	CTA	CCG	ANG	ATG	CTT	CTG	TCT	TGG	CCG	CCG	AAC	ATC	GTG	CCT	1080
	Arg	Glu	Glu	Leu	Arg	Lys	Met	Leu	Leu	Ser	Trp	Pro	Arg	Lys	Ile	Val	Pro	His
	GCC	CAG	ACC	ATG	ACC	GTG	AGT	GTG	GTG	ATC	TGA	TGA	3'					
	Gly	Gln	Asn	Met	Thr	Val	Ser	Val	Val	Ile	***	***						

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶ 識別記号
 A 6 1 K 31/70 A D P
 A D U
 A D N
 A C J
 A A B
 C 0 7 H 21/00
 C 0 7 K 14/47
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/02
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/566
 //(C 1 2 N 5/10
 C 1 2 R 1:91)
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:91)

(31) 優先権主張番号 特願平8-246573
 (32) 優先日 平8(1996)9月18日
 (33) 優先権主張国 日本(JP)
 (72) 発明者 細谷 昌樹
 茨城県土浦市板谷1丁目711番地の83

F I
 A 6 1 K 31/70 A D P
 A D U
 A D N
 A A B
 C 0 7 H 21/00
 C 0 7 K 14/47
 C 1 2 P 21/02 C
 C 1 2 Q 1/02
 G 0 1 N 33/566
 A 6 1 K 37/02 A C J
 C 1 2 N 5/00 B

(72) 発明者 藤井 亮
 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田
 春日ハイツ303号
 (72) 発明者 福住 昌司
 茨城県つくば市並木3丁目17番地6 ロイ
 ヤルシティ並木302号
 (72) 発明者 北田 千恵子
 大阪府堺市南向陽町1丁2番8号